

Expansion regulatorischer T-Zellen mittels eines IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplexes

Dissertation zur Erlangung
des akademischen Grades Doctor medicinae

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von Emanuela Klein
geboren am 25. September 1984 in Leipzig

Angefertigt an der Universität Leipzig, Klinik und Poliklinik für Kinder und Jugendliche

Betreuer PD Dr. med. habil. Holm H. Uhlig

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 19.06.2012

Bibliographische Beschreibung

Klein, Emanuela

Universität Leipzig, Dissertation

100 Seiten, 149 Literaturangaben, 18 Abbildungen, 4 Tabellen

Referat

Regulatorische $\text{Foxp3}^+\text{CD4}^+$ T-Zellen sind essentiell für das Gleichgewicht des intestinalen Immunsystems. Eine Einschränkung ihrer Suppressionsfunktion wird bei Patienten mit Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX)-Syndrom beobachtet und führt im Tiermodell zu lymphoproliferativen Erkrankungen und intestinalen Entzündungen. Von entscheidender Bedeutung für Homöostase und Suppressionsfunktion regulatorischer T-Zellen ist das Signalmolekül Interleukin-2 (IL-2). Im Gegensatz zu Effektor-T-Zellen exprimieren $\text{Foxp3}^+\text{CD4}^+$ T-Zellen den hochaffinen IL-2-Rezeptor $\alpha\beta\gamma$ konstitutiv. IL-2 wird von regulatorischen T-Zellen nicht in relevanten Mengen exprimiert. Sie sind somit auf von anderen Zellen sezerniertes IL-2 angewiesen. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass im Tiermodell regulatorische $\text{Foxp3}^+\text{CD4}^+$ T-Zellen durch Applikation eines IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex nicht nur in mesenterialen Lymphknoten und Milz, sondern auch lokal in der Lamina propria mucosae des Kolons der Versuchstiere expandiert werden.

Als relevante Quelle von IL-2 in situ könnten aktivierte proliferierende T-Zellen dienen. Um dies näher zu untersuchen, wurde die Proteinexpression proliferierender Einzelzellen mittels Matrix assisted laser desorption/ionisation-Time of flight-Massenspektrometrie-Imaging (MALDI-Imaging) analysiert. Es gelang die Identifikation präferentiell in lymphoiden Geweben exprimierter Peptidmassen. Obwohl die Einzelzellanalyse mittels MALDI-Imaging prinzipiell möglich erscheint, ist ein Nachweis von Zytokinen wie IL-2 derzeit aufgrund fehlender Sensitivität im Proteinmassebereich zwischen 10kDa und 20kDa nicht möglich.

Die therapeutischen Möglichkeiten der Expansion regulatorischer Foxp3^+ T-Zellen durch stabile IL-2-Rezeptor-Agonisten und die Rolle von IL-2 für die intestinale Immunregulation sollten weiter untersucht werden.

Inhaltsverzeichnis

Bibliographische Beschreibung	3
Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1. Störung der Barrierefunktion des intestinalen Immunsystems als Ursache chronisch entzündlicher Darmerkrankungen	9
1.2. Foxp3 ⁺ regulatorische T-Zellen	10
1.3. Die Rolle von Interleukin-2 für regulatorische T-Zellen	11
1.4. Signaltransduktion in regulatorischen T-Zellen als Grundlage ihrer selektiven Expansion und Induktion	12
1.5. Möglichkeiten der präferentiellen Expansion regulatorischer T-Zellen	15
1.5.1. Expansion regulatorischer T-Zellen durch Agonisten des hochaffinen IL- 2-Rezeptors.....	15
1.5.2. Induktion regulatorischer T-Zellen durch TGF- β	16
1.5.3. Expansion regulatorischer T-Zellen durch Rapamycin (Sirolimus).....	17
1.5.4. Expansion regulatorischer T-Zellen durch UVB-Bestrahlung bzw. Vitamin D-Rezeptor-Agonisten	18
1.5.5. Expansion regulatorischer T-Zellen durch Histon-Deacetylaseinhibitoren	19
1.6. Suppression von Effektor-T-Zellen durch regulatorische T-Zellen	20
1.6.1. Zellkontaktabhängige Mechanismen	20
1.6.2. Zellkontaktunabhängige Mechanismen	22
1.7. Matrix assisted laser desorption ionisation-Time of flight-Massenspektromie (MALDI-TOF-MS): Bedeutung und Funktion	23
1.8. Zielstellung	25
2. Materialien und Methoden.....	26
2.1. Versuchstiere	26
2.2. IL-2/IgG2b-Fusionsprotein-Vorexperiment.....	26
2.2.1. Induktion von 2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS)-Kolitis.....	26
2.2.2. Durchführung des IL-2/IgG2b-Fusionsprotein-Vorexperimentes	26
2.3. Durchführung des IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex-Experiments	27
2.4. Durchflusszytometrie.....	27
2.5. Histologische Färbungen.....	28
2.5.1. Probenvorbereitung.....	28
2.5.2. Hämatoxylin/Eosin (HE) Färbung	29
2.5.3. Immunfluoreszenz-Färbungen.....	29
2.5.4. Ki67-Schnellfärbung	30

2.5.5. Mikroskopie und Photographie	30
2.6. Histologische Auswertungen	31
2.6.1. Kolitis-Score	31
2.6.2. Bildanalyse.....	31
2.6.3. Validierung der automatischen Bildanalyse mittels CellProfiler.....	33
2.7. MALDI-Imaging	35
2.7.1. Probenvorbereitung für MALDI-Imaging	35
2.7.2. Analyse der Peptidexpression in Gewebeschnitten mittels MALDI-Imaging	36
2.8. Statistische Auswertungen	36
2.8.1. Statistische Tests	36
2.8.2. Berechnung der zu erwartenden Zahl von Kontakten zwischen Ki67 ⁺ und Foxp3 ⁺ Zellen	36
3. Ergebnisse	38
3.1. Design des IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex Experimentes	38
3.2. Mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelte Tiere zeigen Splenomegalie und Lymphadenomegalie	40
3.3. Behandlung mit einem IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex führt zur präferentiellen Expansion regulatorischer T-Zellen in mesenterialen Lymphknoten und Milz.....	41
3.4. Behandlung mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex führt nicht zu Kolitis	43
3.5. Behandlung mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex führt zur präferentiellen Expansion regulatorischer T-Zellen in der Lamina propria mucosae	45
3.6. IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex steigert die Proliferation regulatorischer T-Zellen in der Lamina propria mucosae und lymphoiden Follikeln des Kolons	47
3.7. Regulatorische T-Zellen sind nach Behandlung mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex weiter mit proliferierenden Zellen assoziiert.	50
3.8. MALDI-Imaging als Möglichkeit der Proteinexpressionsanalyse in situ.....	52
3.8.1. Vergleich der Proteinexpression in verschiedenen Geweben von Ileum und Zäkum mit der Expression in Thymus und mesenterialem Lymphknoten.....	55
3.8.2. MALDI-Imaging nach Schnelfärbung Ki67 ⁺ Zellen mit Streptavidin.....	63
3.8.3. Analyse der Massenspektren von Einzelzellen mittels MALDI-Imaging	66
4. Diskussion	68
4.1. Applikation von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex hat keine fatalen Nebenwirkungen	68
4.2. IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex führt zur präferentiellen Expansion regulatorischer T-Zellen in mesenterialen Lymphknoten, Milz und Kolon	70
4.3. IL-10 als wichtiger Vermittler der Suppressionsaktivität durch IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex expandierter regulatorischer T-Zellen.....	71
4.4. Expansion regulatorischer T-Zellen beim Menschen: Voraussetzungen und Chancen.....	72

4.5. Regulatorische T-Zellen akkumulieren an proliferierenden Zellen	73
4.6. Nachweis spezifischer Massen in Gewebe und Einzelzellen mittels MALDI- Imaging	74
5. Zusammenfassung	80
Literaturverzeichnis	83
Publikationen.....	90
Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	97
Lebenslauf	98
Danksagungen.....	99

Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
CD3	Korezeptor des T-Zell-Rezeptors
CD4	Korezeptor des T-Zell-Rezeptors
CD25	α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors
CD28	Korezeptor des T-Zell-Rezeptors
CD103	Integrin α E
CD122	β -Kette des Interleukin-2-Rezeptors
CD132	gemeinsame γ -Kette
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
Cy3	Cyanine 3
Cy5	Cyanine 5
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	Forkhead box P3
GITR	Glucocorticoid-induced TNFR-related protein
HE	Hämatoxylin/Eosin
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1; 2; 4; 7, 9, 10; 15, 21, 23; 35	Interleukin-1; 2; 4; 7, 9, 10, 15; 21, 23; 35
IL-2 R α	α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors
IL-2 R β	β -Kette des Interleukin-2-Rezeptors
LP	Lamina propria mucosae
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MLN	Mesenterialer Lymphknoten
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NF κ B	Nuclear Factor κ B
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
TBS	Tris-buffered saline
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure

1. Einleitung

1.1. Störung der Barrierefunktion des intestinalen Immunsystems als Ursache chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Die Darmschleimhaut ist die größte Kontaktfläche des Menschen mit der Umwelt¹. Das intestinale Immunsystem ist kontinuierlich Eigenantigenen, Nahrungsantigenen, kommensalen Bakterien und pathogenen Mikroorganismen ausgesetzt. Das Mikrobiom des Menschen besteht aus bis zu 36000 verschiedenen Spezies². Toleranzentwicklung gegenüber der Standortflora ist vorteilhaft für den Organismus, muss aber bei möglichst geringem Risiko einer systemischen Infektion erreicht werden. Dies wird durch eine Kombination von mechanischer Barriere, angeborenem und erworbenem Immunsystem ermöglicht¹. Dabei wird die mechanische Barriere von intestinalen Epithelzellen und ihnen aufliegendem Schleim gebildet. Dieser enthält bakterizide Proteine wie Defensine sowie Calprotectine und Cathelicine, die von Paneth-Körnerzellen exprimiert werden^{1,3}. Neben neutrophilen Granulozyten, natürlichen Killer-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen und dendritischen Zellen sind intestinale Epithelzellen Teil des angeborenen Immunsystems. Dessen Zellen exprimieren Pathogenerkennungsrezeptoren und stellen die zweite Barriere gegenüber den Antigenen des Darmlumens dar. Pathogenerkennungsrezeptoren wie der intrazelluläre Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) erkennen bakterielle Strukturbestandteile. Die Rolle von NOD2 bei Infektionen durch Parasiten und Viren wird diskutiert⁴. Bindung von Antigenen an Pathogenerkennungsrezeptoren führt zur Aktivierung und zur Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen¹. Von antigenpräsentierenden Zellen wie etwa den dendritischen Zellen aufgenommene Antigene werden T-Zellen präsentiert⁵. Diese bilden gemeinsam mit B-Zellen das adaptive Immunsystem und somit die dritte Barriere gegenüber intestinalen Antigenen.

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa kommt es sowohl zur Veränderung des enterischen Mikrobioms² als auch zur Störung der genannten drei Barrieremechanismen. Sowohl Tiermodelle als auch genomweite Assoziationsstudien haben in den letzten Jahren wesentlich zum Verständnis des molekularen Pathomechanismus chronisch entzündlicher Darmerkrankungen beigetragen. Aktuell wurde eine Assoziation von über 70 Genen zu Morbus Crohn⁶ und von fast 50 Genen zu Colitis ulcerosa festgestellt⁷. Im Folgenden kann dies nur ansatzweise dargestellt werden.

Neben einer verminderten Schleimproduktion durch einen Verlust von Becherzellen⁸ kommt es zu Veränderungen der Kryptenstruktur und zur Verringerung der Expression von Defensinen durch Paneth-Körnerzellen⁹. Die Adhäsion und das Eindringen von Bakterien ins

Gewebe ist somit erleichtert und führt zur Förderung und Aufrechterhaltung der Entzündungsprozesse⁹. Die besondere Rolle von Pathogenerkennungsrezeptoren bei der Entwicklung intestinaler Entzündungen wird durch die klare Assoziation des NOD2 Gens bei Patienten mit Morbus Crohn deutlich⁶. NOD2 hat jedoch nicht nur Einfluss auf die Signaltransduktion in intestinalen Epithelzellen und anderen Zellen des angeborenen Immunsystems, sondern auch auf Autophagieprozesse¹⁰. Autophagie ist ein wichtiger Mechanismus der Degradation von gealterten Zellorganellen, falsch gefalteten Proteinen, aber auch der Bekämpfung (intrazellulärer) bakterieller und viraler Infektionen¹⁰. Autophagie spielt weiterhin eine wichtige Rolle bei der Präsentation von Fremdanitigenen durch den major histocompatibility complex MHCII⁴. Einige Polymorphismen und daraus resultierende Funktionsminderungen von Autophagiegenen sind mit Morbus Crohn assoziiert¹⁰. Weiterhin wurde festgestellt, dass in Zellen von Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa die Reaktion des endoplasmatischen Retikulums auf Stress, etwa durch anfallende falsch gefaltete Proteine, gestört ist. Dadurch kommt es häufiger zur Dysfunktion und Apoptose von Epithelzellen, Becherzellen und Paneth-Körnerzellen^{10,11}.

Mehrere Gene im IL-12/IL-23-Signalweg wurden in genomweiten Assoziationsstudien als wichtige genetische Prädispositionsfaktoren sowohl für Morbus Crohn als auch Colitis ulcerosa identifiziert¹². IL-23 wird z.B. nach Antigenbindung von Toll-like-Rezeptoren oder NOD2 durch antigenpräsentierende Zellen wie dendritische Zellen exprimiert¹³. Es bewirkt u.a. die Aktivierung von entzündungsfördernden Th17-Zellen, hemmt direkt die Induktion regulatorischer T-Zellen sowie indirekt ihre Differenzierung¹³. Als Ursache chronisch entzündlicher Darmerkrankungen wurde zunächst eine Minderung der Zahl regulatorischer T-Zellen vermutet¹⁴. Entgegen dieser Annahme verhält sich die Zahl regulatorischer T-Zellen jedoch proportional zur Entzündungsaktivität^{15,16}. Von einem bloßen Mangel an regulatorischen T-Zellen ist bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen also nicht auszugehen. Allein bei Patienten mit IPEX-Syndrom, die eine Mutation im Forkhead box P3 (Foxp3)-Gen aufweisen, wird augenscheinlich, dass ein Mangel an regulatorischen T-Zellen zu chronisch entzündlicher Darmerkrankung führen kann¹⁷ (s.a. Kapitel 1.2). Die wichtige Rolle regulatorischer T-Zellen wird auch daran deutlich, dass Patienten mit einem Defekt im IL-10- oder IL-10-Rezeptor-Gen schon im ersten Lebensjahr schwere, therapierefraktäre chronisch entzündliche Darmerkrankungen entwickeln^{18,19} (s.a. Kapitel 1.6.2.2). Eine funktionelle Charakterisierung der Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen ist deshalb zum Verständnis der intestinalen Immunhomöostase essentiell.

1.2. Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen

Natürliche, im Thymus generierte Cluster of differentiation (CD) 4⁺ regulatorische T-Zellen sind meist durch die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 gekennzeichnet²⁰. Dieser

gilt als Hauptregulator der Expression von Proteinen, die den Phänotyp regulatorischer T-Zellen definieren. Dazu gehören Oberflächenmoleküle wie CD25, die α -Kette des IL-2-Rezeptors, Cytotoxic T-cell antigen-4 (CTLA-4) als Korezeptor des T-Zell-Rezeptors und das Mitglied der Tumor necrosis factor (TNF)-Rezeptor-Familie Glucocorticoid-induced TNF-receptor-related Protein (GITR)²⁰. Die Bedeutung von Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen wird beim Menschen durch die fatalen Folgen des IPEX-Syndroms deutlich. Die Erkrankung wird X-chromosomal vererbt. Betroffene Jungen leiden aufgrund eines Mangels an funktionstüchtigen regulatorischen T-Zellen u.a. an Typ-1 Diabetes, Pankreatitis, Thyroiditis und autoimmuner hämolytischer Anämie. Im Rahmen des IPEX-Syndroms am häufigsten betroffen sind Ileum und Kolon, was die Bedeutung regulatorischer T-Zellen für die Aufrechterhaltung der Homöostase des intestinalen Immunsystems unterstreicht^{15,21}. Ohne Behandlung, etwa durch eine Knochenmarkstransplantation, verläuft das IPEX-Syndrom tödlich²². Foxp3 kann bei T-Zellen nicht nur im Thymus, sondern auch in der Peripherie induziert werden. Von besonderer Bedeutung ist dabei das intestinale Immunsystem¹. Neben Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen wurde eine regulatorische Aktivität auch bei einigen Foxp3⁻ T-Zell-Subpopulationen nachgewiesen. Dazu gehören etwa IL-10 produzierende Tr1-Zellen, Transforming growth factor (TGF)- β sezernierende TH3-Zellen und einige CD8⁺CD28⁻ T-Zellen²⁰. In dieser Arbeit stehen CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen im Mittelpunkt, unabhängig davon, ob sie im Thymus gebildet wurden oder durch Induktion von Foxp3 in der Peripherie entstanden sind.

1.3. Die Rolle von Interleukin-2 für regulatorische T-Zellen

IL-2 hat eine α -Helix-Struktur und besitzt bei Mäusen eine Größe von 19400Da. Bei Menschen hat es eine Größe von 17628Da (²³; Protein knowledge base; www.uniprot.org). Es wird fast ausschließlich von aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimiert²⁴. Regulatorische T-Zellen schütten keine relevanten Mengen von IL-2 aus, da die Produktion von IL-2 durch den Transkriptionsfaktor Foxp3 gehemmt wird. Foxp3 bindet zusammen mit Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) an den IL-2-Promoter und bewirkt so eine Repression der IL-2-Expression²⁴. Der IL-2-Rezeptor $\alpha\beta\gamma$ wird konstitutiv von regulatorischen T-Zellen exprimiert. Andere T-Zellen exprimieren ihn lediglich nach Aktivierung. Der hochaffine IL-2-Rezeptor besteht aus drei Untereinheiten, dem IL-2-Rezeptor α (CD25), IL-2-Rezeptor β (CD122) und der gemeinsamen γ -Kette (CD132). CD25 sorgt für eine besonders affine Bindung des IL-2, nimmt jedoch nicht an der Signaltransduktion teil²⁵. CD122 ist nicht nur die β -Kette des IL-2-Rezeptors, sondern auch Teil des IL-15-Rezeptors. Die gemeinsame γ -Kette ist neben dem Rezeptor für IL-2 auch Teil der Rezeptoren für IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21²⁶.

Historisch wurde IL-2 als T-Zell-Wachstumsfaktor bezeichnet. Erst später wurde seine Bedeutung für regulatorische T-Zellen erkannt. Diese wird daran deutlich, dass Versuchstiere, welche einen Defekt im IL-2- oder IL-2-Rezeptor α - oder β -Gen haben, spontan ein schweres Autoimmunsyndrom entwickeln. Es manifestiert sich zunächst mit Lymphadenopathie, Splenomegalie, entzündlicher Darmerkrankung, autoimmuner hämolytischer Anämie und einem erhöhten Anteil von Effektor-T-Zellen in der Peripherie. Schließlich mündet es in multiplen T-Zell-Infiltraten in Kolon, Pankreas und anderen Organen und führt zum Tod der Tiere. Hierbei ähneln sich die Phänotypen für Tiere mit einem Defekt im IL-2-Gen, im Gen für CD25 oder CD122^{24,27,28}. Scurfy Mäuse, die kein Foxp3 produzieren können, leiden an ähnlichen Symptomen, der Verlauf ihres Autoimmunsyndroms ist jedoch fulminanter. Ein Defekt des IL-2/IL-2-Rezeptorsystems hat somit nur geringen Einfluss auf die Funktion von Effektorzellen, ist aber von entscheidender Bedeutung für regulatorische T-Zellen. Bei Versuchstieren, die IL-2 transgen überexprimieren, ist die Zahl Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen auf das 6-fache erhöht²⁸. IL-2 ist also *in vivo* für Funktion und Homöostase regulatorischer T-Zellen in der Peripherie von entscheidender Bedeutung. Im Thymus scheint die Induktion eines regulatorischen Phänotyps hingegen unabhängig von IL-2 zu sein²⁹.

1.4. Signaltransduktion in regulatorischen T-Zellen als Grundlage ihrer selektiven Expansion und Induktion

Die Signaltransduktion regulatorischer T-Zellen unterscheidet sich von der Signaltransduktion bei Effektor-T-Zellen. Damit ergeben sich Ansatzpunkte für die präferentielle Expansion regulatorischer T-Zellen und für die Steigerung der Suppressionsaktivität dieser Zellen. Wichtige Rezeptoren regulatorischer T-Zellen sind der T-Zell-Rezeptor mit seinem Korezeptoren CD4 und CTLA-4, der hochaffine IL-2-Rezeptor $\alpha\beta\gamma$, sowie der TGF- β -Rezeptor (Abbildung 1). Signale dieser Rezeptoren werden über drei Haupttransduktionswege weitergeleitet:

1. IL-2-Rezeptor-Janus Kinase (JAK)3-Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)5-Weg (Abbildung 1 B)
2. Linker of activated T cells (LAT)-Phospholipase C (PLC) γ -NFAT bzw. NF κ B-Weg (Abbildung 1 D)
3. TGF- β -mothers against decapentaplegic homolog (SMAD)3-Weg²³ (Abbildung 1 E).

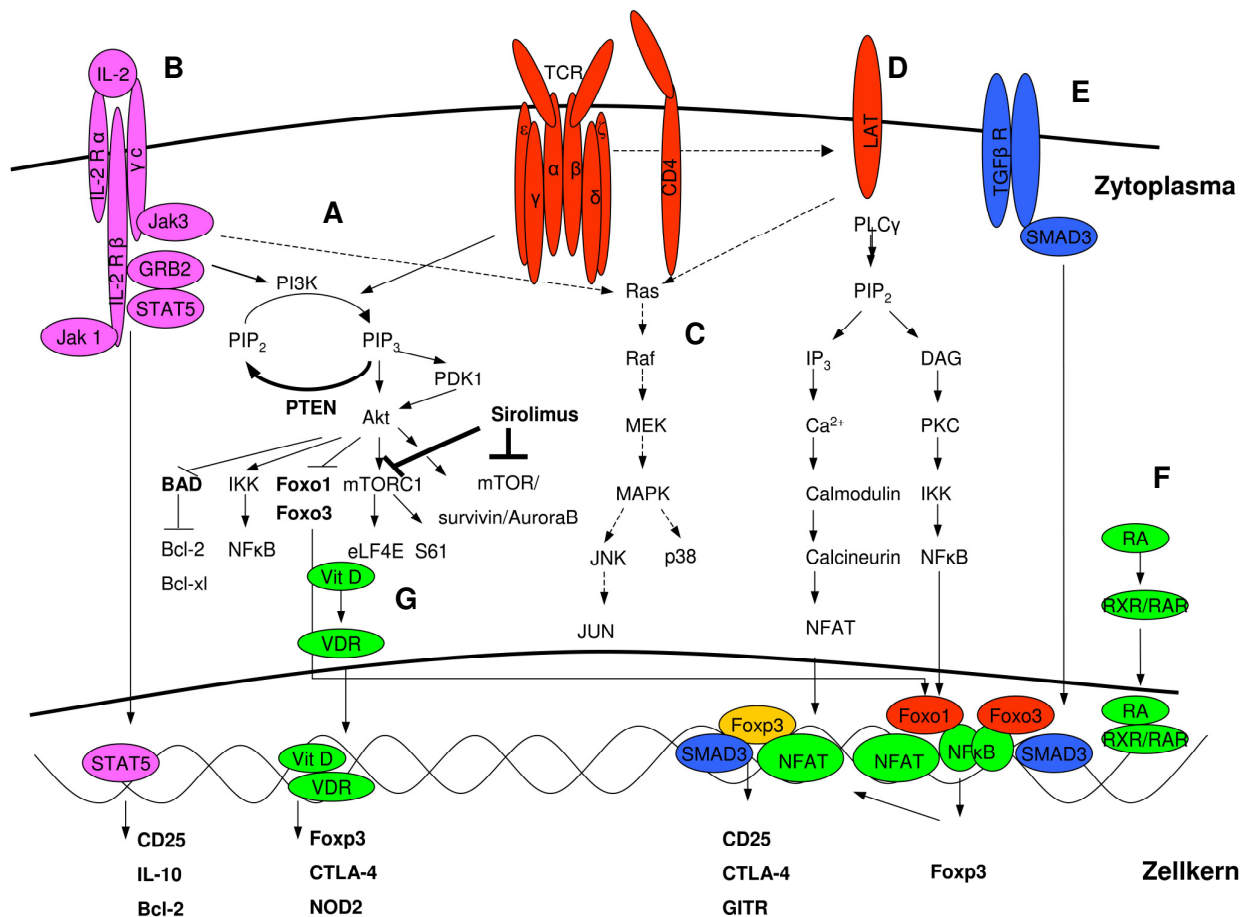


Abbildung 1 Signaltransduktion regulatorischer T-Zellen

Die wichtigsten Rezeptoren regulatorischer T-Zellen sind der T-Zell-Rezeptor (TCR) mit seinen Korezeptoren (orange), der IL-2-Rezeptor (rosa) und der TGF- β -Rezeptor (blau)²³. **A** Der PI3K-Akt-Weg integriert die Signale des T-Zell-Rezeptors und des IL-2-Rezeptors. Durch die verstärkte Aktivität von PTEN bei regulatorischen T-Zellen wird Akt weniger stark phosphoryliert. Seine Aktivität ist damit bei regulatorischen T-Zellen gemindert³⁰. Folge ist eine verstärkte Aktivität der Transkriptionsfaktoren Foxo1 und Foxo3 sowie eine geringere Empfindlichkeit regulatorischer T-Zellen gegenüber Rapamycin (Sirolimus). Zusammen mit NFAT und SMAD3 wirken Foxo1 und Foxo3 als Transkriptionsfaktor für Foxp3^{30,31}. **B** Das Signal des IL-2-Rezeptors $\alpha\beta\gamma$ wird aufgrund der Hemmung des PI3K-Akt-Weges verstärkt über STAT5 transduziert. STAT5 verstärkt als Transkriptionsfaktor die Expression von CD25, IL-10 und des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2³². **C** Die Aktivität des MEK-MAPK-Weges ist in regulatorischen T-Zellen gemindert^{33,34}. **D** Die Phosphorylierung von LAT ist bei regulatorischen T-Zellen eingeschränkt^{35,36}. Trotzdem ist die Interaktion von LAT und Phospholipase Cy und damit der IP_3 - Ca^{2+} -NFAT- sowie DAG-PKC-NF κ B-Weg von Bedeutung für regulatorische T-Zellen. Sowohl NFAT als auch NF κ B sind am Transkriptionsfaktorkomplex für die Expression von Foxp3 beteiligt. **E** Die Signale des TGF- β -Rezeptors werden über SMAD3 transduziert. Auch SMAD3 ist am Transkriptionsfaktorkomplex für Foxp3 beteiligt. Zusammen mit NFAT und Foxp3 wirkt SMAD3 als Transkriptionsfaktor für CTLA-4, GITR und CD25^{37,38}. **F** Durch Retinsäure aktivierter Retinsäure-Rezeptor verstärkt die Induktion von Foxp3 durch TGF- β ³⁹. **G** Aktiviertes Vitamin D trägt zur Induktion von Foxp3 bei und fördert u.a. die Expression von CTLA-4 und NOD2⁴⁰⁻⁴².

Der Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt-Transduktionsweg integriert die Signale des T-Zell-Rezeptors und des IL-2-Rezeptors³⁰. Durch PI3K-Akt werden u.a. die Kinase Molecular target of Rapamycin (mTOR) und mittelbar das anti-apoptotische Protein B-cell-lymphoma (Bcl)-2 aktiviert. Die Transkriptionsfaktoren Forkhead box (Fox)o1 und Foxo3 werden inaktiviert^{30,31}. Der PI3K-Akt-Weg ist bei regulatorischen T-Zellen durch deren gesteigerte

Aktivität des Phosphatase and tensin homolog (PTEN) gehemmt³⁰ (Abbildung 1 A). PTEN katalysiert die Rückreaktion von Phosphatidylinositol 3-phosphat (PIP₃) zu Phosphatidylinositol 2-phosphat (PIP₂). Seine Aktivität wirkt damit der Signaltransduktion über PI3K-Akt entgegen³⁰. Daraus erklärt sich eine verminderte Aktivität von mTOR bei regulatorischen T-Zellen und eine nur marginale Einschränkung der Homöostase regulatorischer T-Zellen bei Gabe von mTOR-Inhibitoren wie Rapamycin. Die Aktivität von Foxo1 und Foxo3 ist bei Inhibition des PI3K-Akt Weges durch PTEN gesteigert. Foxo1 und Foxo3 sind für die Aktivität des Foxp3-Promoters, die Generation regulatorischer T-Zellen im Thymus und die Induktion von Foxp3 bei T-Zellen in der Peripherie von essentieller Bedeutung^{31,43}. Die Suppressionsfähigkeit regulatorischer T-Zellen mit einem Defizit an Foxo1 und Foxo3 ist eingeschränkt. Die Versuchstiere entwickeln spontan ein Autoimmunsyndrom³¹. Bei Versuchstieren, die eine konstitutiv aktive Akt-Kinase besitzen, ist die Expression von Foxp3 und anderer für regulatorische T-Zellen typischer Proteine wie CTLA-4 und CD25 gehemmt^{33,34}.

Aufgrund der Hemmung des PI3K-Akt-Weges durch PTEN wird bei regulatorischen T-Zellen das IL-2-Signal hauptsächlich über den JAK-STAT-Weg transduziert. Die Bindung von IL-2 an seinen hochaffinen Rezeptor $\alpha\beta\gamma$ bewirkt die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Anteile von CD122 und CD132 durch JAK 1 bzw. JAK 3 (Abbildung 1 B). Dies führt zur Aktivierung von STAT5 und dessen Translokation in den Kern. Dort wirkt er als Transkriptionsfaktor u.a. für CD25³². Auch in der Foxp3-Promoterregion wurden mehrere Bindungsstellen für STAT5 identifiziert. STAT5 könnte damit einen direkten Einfluss auf die Induktion und Aufrechterhaltung der Expression von Foxp3 besitzen⁴⁴. IL-2 ist essentiell für die Homöostase regulatorischer T-Zellen, nicht jedoch für deren Generation im Thymus²⁹. Hingegen hat STAT5 nonredundante Funktion für regulatorische T-Zellen sowohl bei der Induktion von Foxp3 im Thymus als auch zur Aufrechterhaltung der Suppressionsfunktion peripher⁴⁵. Neben der Wirkung als Transkriptionsfaktor für CD25 bindet STAT5 am Enhancer für IL-10. STAT5 sorgt außerdem für eine verstärkte Expression des anti-apoptotischen Moleküls Bcl-2^{46,47}. Die Aktivierung von STAT5 allein ist jedoch nicht ausreichend, um die Expression von Foxp3 zu induzieren^{45,48}. Bei einer Patientin mit einem Defekt im STAT5b-Gen wurde ein mildes Autoimmunsyndrom mit erhöhten Werten von IgG und IgA festgestellt. Es waren keine Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen detektierbar. Die Suppressionsfunktion CD4⁺CD25^{high+} T-Zellen war vermindert⁴⁹. Ein lebensbedrohliches Autoimmunsyndrom, wie es etwa bei IPEX-Patienten auftritt, manifestierte sich nicht, da auch die Aktivität von Effektorzellen durch das Fehlen von STAT5 beeinträchtigt war.

Bei regulatorischen T-Zellen ist die Phosphorylierung von LAT nach Antigenbindung des T-Zell-Rezeptors gemindert³⁵. Somit ist auch die Aktivität der Proteine erniedrigt, die sich downstream von LAT und der Phospholipase C γ (PLC γ) befinden. Dies sind Calmodulin, Calcineurin und der Transkriptionsfaktor NFAT einerseits und Proteinkinase C und NF κ B andererseits (Abbildung 1 D,E). Dennoch ist eine suffiziente LAT-PLC γ Interaktion essentiell für die Expression von IL-10 und TGF β regulatorischer T-Zellen und damit für die Suppressionsfunktion dieser Zellen³⁶. NFAT bildet mit SMAD3, dem Zielprotein des TGF β -Rezeptors, sowie c-Rel, einem Mitglied der NF κ B Familie, im Zellkern einen Komplex, der eine entscheidende Rolle für die Induktion von Foxp3 durch TGF- β hat^{38,50,51}. Zusammen mit Foxp3 und SMAD3 führt NFAT zur Expression typischer Oberflächenmoleküle regulatorischer T-Zellen wie der α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25), CTLA-4 und GITR⁵²⁻⁵⁴. Foxp3 verhindert die Bindung von NFAT an den Promoter von IL-2 und damit die Expression von IL-2 in regulatorischen T-Zellen⁵⁵.

1.5. Möglichkeiten der präferentiellen Expansion regulatorischer T-Zellen

Eine Expansion regulatorischer T-Zellen kann durch Rezeptor-Agonisten z.B. des IL-2-Rezeptors, durch Beeinflussung der Signaltransduktion in der Zelle, etwa durch Rapamycin oder aber durch unmittelbaren Eingriff in die Transkriptionsaktivität z.B. durch Vitamin D/Vitamin D-Rezeptor oder Histon-Deacetylaseinhibitoren erreicht werden. Eine Expansion kann *in vitro* oder *in vivo* vorgenommen werden.

1.5.1. Expansion regulatorischer T-Zellen durch Agonisten des hochaffinen IL-2-Rezeptors

Im Gegensatz zu anderen T-Zellen exprimieren regulatorische T-Zellen den hochaffinen IL-2-Rezeptor $\alpha\beta\gamma$ konstitutiv und hoch. Eine Expansion regulatorischer T-Zellen *in vivo* mittels IL-2 ist möglich, jedoch aufgrund der im Bereich von wenigen Minuten liegenden Halbwertszeit von IL-2, der unbefriedigenden Selektivität für regulatorische T-Zellen und den daraus resultierenden Nebenwirkungen (s.a. 4.1) nicht praktikabel⁵⁶⁻⁵⁸. Boyman et al haben gezeigt, dass durch die Applikation von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex *in vivo* regulatorische T-Zellen induziert und präferentiell expandiert werden können⁵⁹. Durch Bindung an einen spezifischen Antikörper wird die Halbwertszeit des IL-2 auf mindestens 24h verlängert. Es ist noch nach 72h nachweisbar^{60,61}. Auch IL-2/IgG2b-Fusionsprotein hat eine lange Halbwertszeit, ist jedoch weniger effektiv als IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex⁶¹. Dies weist darauf hin, dass es neben der Verlängerung der Halbwertszeit noch andere Wirkmechanismen des Antikörperkomplexes gibt, die zu einer Expansion regulatorischer T-Zellen führen⁶¹. Das durch den anti-IL-2-Antikörper gebundene Epitop ist dabei wahrscheinlich von entscheidender Bedeutung. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete anti-IL-2-Antikörper des Klons JES6-1 soll mit der Bindungsstelle des IL-2 für CD122 interagieren und somit dessen Bindung an den IL-2-Rezeptor $\beta\gamma$ erschweren. Die Bindung

an CD25 und damit den hochaffinen IL-2-Rezeptor wird damit relativ gefördert. Es kommt zur Induktion und präferentiellen Expansion regulatorischer T-Zellen⁶¹. Hingegen soll der anti-IL-2-Antikörper des Klons S4B6 die Bindungsstelle des IL-2 für CD25 blockieren und damit die Bindung des IL-2 an den hochaffinen IL-2-Rezeptor $\alpha\beta\gamma$ verhindern⁶¹. Die Bindung des IL-2 an den IL-2-Rezeptor $\beta\gamma$ von mittlerer Affinität wird somit unterstützt. Durch Applikation von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex des Klons S4B6 werden Effektor-T-Zellen und NK-Zellen in ihrer Proliferation und Funktion gefördert^{59,60}.

Im Tiermodell führt eine Applikation von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex zur Expansion regulatorischer T-Zellen auf mindestens das 4-fache der Zahl, die mit Kontrollantikörpern erreicht wird^{56,59,61,62}. Regulatorische T-Zellen von mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Versuchstieren exprimieren deutlich mehr für einen regulatorischen Phänotyp typische Oberflächenproteine wie CD25 und CTLA-4 als regulatorische T-Zellen von Kontrolltieren. Sie supprimieren *in vitro* suffizient die Proliferation von aktivierten Effektor-T-Zellen⁶². Behandelt man Versuchstiere vor Induktion einer experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex, so sind die Symptome im Vergleich zu Kontrolltieren gemildert und eine Remission tritt früher ein. Dies gilt besonders bei Koapplikation von Rapamycin⁶². Ähnliche Ergebnisse lassen sich auch in einem Modell für allergisches Asthma nachweisen. Nach Behandlung mit einem IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex sind mukosale Infiltrate deutlich verringert und auch die Gesamtzellzahl und Anzahl von eosinophilen Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage sind geringer als in Vergleichsgruppen. Dies führt zu verminderter bronchialer Hyperreagibilität im Metacholin-Provokationstest. Dabei ist die Expansion der regulatorischen T-Zellen abhängig von STAT5 und IL-10⁵⁶. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wird IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex bereits bei Induktion des jeweiligen Krankheitsmodells appliziert. Dies macht die Methode etwa für die Vorbereitung von Organtransplantationen interessant. Nach nur dreimaliger Injektion von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex verhindern die expandierten regulatorischen T-Zellen eine Abstoßungsreaktion gegen allogene transplantierte Pankreasinselnzellen dauerhaft⁶². Interessant ist, dass eine Expansion regulatorischer T-Zellen durch IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex auch die Auswirkungen von experimenteller Myasthenia gravis, einer B-Zell-induzierten Erkrankung, mildert⁶³. Daraus kann eine suppressive Wirkung regulatorischer T-Zellen auch auf B-Zellen abgeleitet werden.

1.5.2. Induktion regulatorischer T-Zellen durch TGF- β

TGF- β kann von fast allen tierischen und menschlichen Zellen exprimiert werden. Ebenso viele Zelltypen exprimieren TGF- β -Rezeptoren. TGF- β kann peripher eine Induktion regulatorischer T-Zellen bewirken. Eine Foxp3-Induktion bei CD4⁺ T-Zellen *in vitro* ohne die Anwesenheit von TGF- β ist nicht möglich⁶⁴. Die genauen Mechanismen der Induktion sind

noch ungeklärt, jedoch spielt SMAD3 als Transduktionsmolekül des TGF- β -Signals eine wichtige Rolle (Abbildung 1 E). Zusammen mit NFAT und NF κ B sowie Foxo1 und Foxo3 induziert es die Expression von Foxp3. Die Notwendigkeit des gemeinsamen Vorhandenseins dieser Transkriptionsfaktoren als „coincidence detector“³⁶ erklärt die genaue Regulation der Foxp3-Induktion trotz der ubiquitären Expression von TGF- β .

Die Induktion regulatorischer T-Zellen durch TGF- β ist abhängig vom herrschenden Zytokinmilieu. Bei gleichzeitiger Applikation von TGF- β und IL-6 kommt es *in vitro* nicht zur Induktion regulatorischer T-Zellen sondern zur Konversion von CD4⁺ T-Zellen zum Th-17 Phänotyp. Eine Gabe von Retinsäure verhindert dies (Abbildung 1 F). Die Induktion regulatorischer T-Zellen wird bei Koapplikation von IL-2 verstärkt^{39,64}. Retinsäure wird von dendritischen Zellen der Lamina propria mucosae sezerniert. Dies erklärt die hohe Zahl induzierter regulatorischer T-Zellen im lymphoiden Gewebe des Darms. Nach Bindung an seinen Rezeptor fördert Retinsäure bei T-Zellen die Transkription der Darm-Homing Rezeptoren Integrin $\alpha 4\beta 7$ und Chemokinrezeptor 9^{65,66}. Mangel an Vitamin A bzw. Retinsäure führt so zur Minderung der Gesamtzahl von T-Zellen in der Lamina propria mucosae⁶⁷. Durch Gabe von TGF- β und Retinsäure kann eine Kolitis im CD45RB^{high+} T-Zell-Transfer-Modell verhindert werden³⁹. Dabei wird durch Transfer von CD45RB^{high+}CD4⁺ T-Zellen in immuninkompetente rag^{-/-} Versuchstiere eine experimentelle Kolitis induziert⁶⁸. Werden hingegen unfraktionierte T-Zellen oder ausschließlich regulatorische T-Zellen transferiert bzw. Stoffe appliziert, die zur Konversion von CD45RB^{high+}CD4⁺ T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen führen, kommt es nicht zur Kolitis^{68,69}. Retinsäure allein hat keinen Effekt auf die Induktion von Foxp3 bei CD4⁺ T-Zellen³⁹.

1.5.3. Expansion regulatorischer T-Zellen durch Rapamycin (Sirolimus)

Rapamycin beeinflusst die Signaltransduktion verschiedener Zellen, darunter dendritische Zellen und T-Zellen³⁰. Bei CD4⁺ T-Zellen greift es direkt an zwei mTOR-Komplexen (mTORC1 und mTOR-Survivin-AuroraB) an. mTORC1 ist an der Transduktion von Signalen des T-Zell-Rezeptors und des IL-2-Rezeptors über PI3K-Akt beteiligt. Eine Aktivierung führt u.a. zum Übergang der Zelle in die G1-Phase, zu einer Aktivierung von NF κ B und zur Transkription von IL-2 und IL-2-Rezeptor. Der mTOR-Survivin-AuroraB-Komplex transduziert ebenfalls T-Zell-Rezeptor-Signale und ist dabei insbesondere von der Aktivierung des Korezeptors CD28 abhängig³⁰. Signaltransduktion über mTOR-Survivin-AuroraB führt zum Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase⁷⁰. Durch die erhöhte Aktivität von PTEN bei regulatorischen T-Zellen ist der PI3K-Akt-Weg und damit auch mTOR bei regulatorischen T-Zellen von geringerer Bedeutung als bei Effektor-T-Zellen³⁰ (Abbildung 1 A und B). Daraus erklärt sich eine verminderte Aktivität von mTOR bei regulatorischen T-Zellen und eine nur marginale Einschränkung der Homöostase regulatorischer T-Zellen bei Gabe von

Hemmstoffen von mTORC1. Die Bedeutung des JAK-STAT-Weges bei der Signaltransduktion regulatorischer T-Zellen wird durch erhöhte Werte von STAT3 und STAT5 besonders nach Applikation von Rapamycin deutlich^{33,34,71}. Eine Blockade der Rapamycin-empfindlichen mTOR-Komplexe führt *in vitro* bei geringer IL-2-Stimulation suffizient zur Verhinderung der Proliferation von T-Zellen. Bei optimalem IL-2-Angebot kann Rapamycin die Zellteilung nur hinauszögern⁷². Die Suppressionsfähigkeit und das Proliferationsvermögen regulatorischer T-Zellen nach Gabe von Rapamycin sind nicht wesentlich beeinträchtigt. Im Gegenteil werden regulatorische T-Zellen unter diesen Bedingungen selektiv expandiert³⁴. Die expandierten regulatorischen T-Zellen exprimieren typische Oberflächenmoleküle wie CTLA-4, GITR und das Zelladhäsionsmolekül CD62L^{33,73}. Während Effektor-T-Zellen unter Rapamycin-Gabe vermehrt durch Apoptose depletiert werden, exprimieren regulatorische T-Zellen bei Applikation von Rapamycin anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2³⁰. Ein weiterer Mechanismus, wie regulatorische T-Zellen sich der Proliferationshemmung durch Rapamycin entziehen, ist die Heraufregulation von Pim2 durch Foxp3. Pim2 ist eine Serin/Threonin-Kinase, die funktionell Ähnlichkeit mit Akt und mTOR besitzt und auch einige der angesteuerten Ziele teilt. Durch vermehrte Expression von Pim2 können regulatorische T-Zellen die Hemmung der Kinase mTOR kompensieren⁷⁴. Bei Langzeit-Typ-I-Diabetikern bewirkt eine Behandlung mit Rapamycin weder eine Depletion von T-Zellen noch eine Expansion regulatorischer T-Zellen. Es konnte lediglich eine verbesserte Suppressionsfähigkeit regulatorischer T-Zellen nach Behandlung mit Rapamycin festgestellt werden. Dies führte jedoch nicht zu einem erniedrigten Insulinbedarf der Patienten⁷³. Dies könnte darin begründet liegen, dass bei Langzeit-Typ-1-Diabetikern kein aktives Entzündungsgeschehen vorliegt. Bei einer Patientin mit therapierefraktärem Morbus Crohn konnte durch Rapamycin eine Remission erreicht werden⁷⁵.

1.5.4. Expansion regulatorischer T-Zellen durch UVB-Bestrahlung bzw. Vitamin D-Rezeptor-Agonisten

Der intrazelluläre Vitamin D-Rezeptor (Abbildung 1, VDR) wird u.a. von dendritischen Zellen, T-Zellen und Keratinozyten exprimiert. Nach Bindung seines Liganden wirkt er als Transkriptionsfaktor für z.B. NOD2⁴². Vitamin D kann entweder von außen zugeführt oder durch UVB-Strahlung angeregt synthetisiert werden. Bei Steigerung der Konzentration von Vitamin D-Rezeptor-Agonisten kommt es zur Hemmung der Reifung dendritischer Zellen. Die Präsentation von Korezeptoren wie CD80/86 (B7.1, B7.2) und CD40 bei dendritischen Zellen ist bei gesteigerter Aktivierung des Vitamin D-Rezeptors gemindert. Dies führt zu geringerer Effektivität der Antigenpräsentation und somit geminderter Aktivierung von Effektor-T-Zellen^{40,76}. Über Induktion des Receptor-activator of NFκB ligand (RANKL), einem Mitglied der TNF-α Familie bei Keratinozyten, bewirkt UVB-Bestrahlung oder Applikation eines VDR-

Agonisten *in vivo* die Induktion von Foxp3 bei CD4⁺ T-Zellen⁴⁰. Dadurch kann das Priming zytotoxischer T-Zellen gegenüber einem Allergen verhindert werden⁴⁰. Selbst in einer Kokultur von Effektor-T-Zellen und regulatorischen T-Zellen ohne dendritische Zellen bewirken Vitamin D-Rezeptor-Agonisten die Expansion regulatorischer T-Zellen. 1,25 Dihydroxyvitamin D3 bewirkt *in vitro* zunächst eine Proliferationshemmung von CD4⁺CD25⁻ Effektor-T-Zellen und führt zur Minderung der Expression proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ , IL-17 und auch IL-2. Nach wenigen Tagen wird die Expression von Foxp3 und CTLA-4 und damit der Phänotyp regulatorischer T-Zellen induziert. Dieser Effekt wird durch die Zugabe von IL-2 verstärkt. Die so gewonnenen induzierten regulatorischen T-Zellen hemmen in einem Suppressionsassay die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen⁷⁷. Dies könnte einen Grund für den positiven Effekt von Vitamin D-Substitution auf den Verlauf chronisch entzündlicher Darmerkrankungen darstellen⁴².

1.5.5. Expansion regulatorischer T-Zellen durch Histon-Deacetylaseinhibitoren

Im Zellkern befindet sich die DNA in enger Assoziation zu Histonen und ist in Nukleosomen angeordnet. Die Histon-Acetyltransferase katalysiert die Acetylierung von Lysinresten der Aminosäureseitenketten von Histonen. Dies führt zur Auflockerung des Chromatins, bis auf einige Ausnahmen zur erleichterten Bindung von Transkriptionsfaktoren und damit zur verstärkten Expression z.B. von Zytokinen⁷⁸. Auch Nicht-Histon-Proteine wie Foxp3 und NF κ B werden acetyliert und können von Histon-Deacetylase deacetyliert werden. Dies führt zur Beeinflussung von Eigenschaften wie Stabilität, Lokalisation in der Zelle (Kern oder Zytosol), Interaktion mit anderen Proteinen, Bindungsfähigkeit an die DNA und Stärke der enzymatischen Aktivität⁷⁹. Die Rekrutierung von Histon-Acetyltransferasen durch Foxp3 trägt zur Suppression der IL-2-Expression regulatorischer T-Zellen bei⁸⁰. Die am besten untersuchten Histon-Deacetylaseinhibitoren sind Natrium-Butyrat, Valproat und die Hydroxamsäuren Trichostatin A und Suberoylanilid Hydroxamsäure. Behandelt man Versuchstiere mit Trichostatin A, so steigt der Anteil Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen in Lymphknoten und Milz⁸¹. Diese regulatorischen T-Zellen exprimieren mehr Foxp3, CTLA-4, GITR und IL-10 als regulatorische T-Zellen der Kontrollgruppe. Das Foxp3 behandelte Tiere weist dabei eine vermehrte Acetylierung auf und ist öfter an die IL-2-Promoterregion gebunden als bei unbehandelten Tieren. Die regulatorischen T-Zellen behandelte Tiere zeigen sich im Suppressionsassay 2- bis 3mal so effektiv wie die der Vergleichsgruppe. *In vitro* führt die Behandlung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit Trichostatin A zu deren Konversion zu regulatorischen T-Zellen und zur Induktion der Expression von CD25, Foxp3 und CTLA-4.

Auch regulatorische T-Zellen von Tieren mit einer defekten Histon-Deacetylase exprimieren signifikant mehr Foxp3 und können proliferierende T-Zellen deutlich besser supprimieren als regulatorische T-Zellen von Vergleichstieren. Werden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit einem Foxp3-

Gen transfiziert, das bei Foxp3 zum Austausch von Lysin zu Histidin führt und damit weniger acetyliert werden kann, sind sie nicht in der Lage, proliferierende Effektor-T-Zellen zu supprimieren und exprimieren IL-2. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen, die mit einem intakten Foxp3-Gen transfiziert werden, sind hingegen zur Suppression in der Lage und produzieren kein IL-2⁸¹. Eine Behandlung mit Trichostatin A führt zur Toleranz gegenüber allogen transplantierten Pankreasinseln und Herzen⁸¹. Mit Trichostatin A oder Suberoylanilid Hydroxamsäure behandelte Tiere sind weniger empfindlich gegen Dextran-Sulfat-Natrium (DSS)-Kollitis. Auch eine T-Zell-Transfer-Kollitis kann durch Gabe von Trichostatin A bzw. Suberoylanilid Hydroxamsäure verhindert bzw. behandelt werden⁷⁸. Die konvertierten regulatorischen T-Zellen können im Suppressionsassay aktivierte T-Zellen an der Proliferation hindern⁸². Einige Deacetylaseinhibitoren befinden sich in klinischen Studien für den Einsatz als Tumorstatika. Die Studien befassen sich dabei besonders mit der Behandlung hämatologischer Tumoren, da Histon-Deacetylaseinhibitoren die Proliferation dieser Tumorzellen hemmen und Apoptose auslösen können⁸³.

1.6. Suppression von Effektor-T-Zellen durch regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen wirken sowohl antiproliferativ als auch proapoptotisch auf Effektor-T-Zellen. Eine direkte Suppression kann von indirekter Suppression über antigenpräsentierende Zellen unterschieden werden. Zellkontaktabhängige Suppression etwa durch CTLA-4 und membrangebundenes TGF- β wird von zellkontaktunabhängiger Suppression durch Zytokine wie IL-10 abgegrenzt^{84,85}.

1.6.1. Zellkontaktabhängige Mechanismen

1.6.1.1. Suppression durch Cytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen-4 (CTLA-4, CD152)

CTLA-4 ist ein Korezeptor des T-Zell-Rezeptors, der in seiner Struktur CD28 ähnelt und dessen Liganden CD80 und CD86 sind. CTLA-4 wird von regulatorischen T-Zellen konstitutiv exprimiert. Nicht-regulatorische CD4⁺ T-Zellen exprimieren es nur nach Aktivierung⁸⁶. Bei diesen überwiegt die Expression von CD28. CD80 und CD86 werden von antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert und durch CTLA-4 mit höherer Affinität gebunden als durch CD28⁸⁶. Suppression kann durch CTLA-4 mithilfe verschiedener Mechanismen vermittelt werden. Die Bindung von CTLA-4 führt zur Minderung der Expression von CD80/86 bei antigenpräsentierenden Zellen⁸⁷. Weiterhin kann durch Bindung von CTLA-4 an CD80/86 die Expression von Indoleamin 2,3-dioxygenase bei antigenpräsentierenden Zellen induziert werden. Dieses Enzym katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Tryptophankatabolismus. Tryptophan wird dabei zu verschiedenen Kynureninen abgebaut. Antigenpräsentierende Zellen wirken supprimierend auf Effektor-T-Zellen, indem sie in Konkurrenz um die essentielle Aminosäure

Tryptophan treten und die für Effektorzellen proapoptotisch wirkenden Kynurenine exprimieren⁸⁸.

In vitro korreliert die CTLA-4-Expression regulatorischer T-Zellen mit deren Suppressionsaktivität. Versuchstiere, die einen Defekt im CTLA-4 Gen aufweisen, entwickeln schon pränatal multiple entzündliche Organinfiltrate und ein schweres Autoimmunsyndrom⁸⁹. Tiere mit einem Mangel an CTLA-4 ausschließlich in regulatorischen T-Zellen entwickeln sich in den ersten Wochen normal, leiden im Verlauf jedoch an Ödemen, Kardiomegalie, Lymphadenopathie, Splenomegalie sowie Aszites⁸⁹. CTLA-4-defiziente regulatorische T-Zellen entwickeln sich normal im Thymus, ihre periphere Proliferation ist verstärkt. Die Suppressionsaktivität dieser Zellen ist jedoch gestört, sie können einen Autoimmundiabetes nicht verhindern⁸⁷. Beim Menschen wurden vermehrt Polymorphismen im CTLA-4-Gen bei Diabetes mellitus Typ-1, systemischem Lupus erythematodes, multipler Sklerose und Morbus Addison festgestellt⁸⁷.

1.6.1.2. Suppression durch Granzyme und Perforine

Bei *in vitro*-Studien wurde festgestellt, dass regulatorische T-Zellen mit einem defekten Granzym B-Gen weniger effektiv die Proliferation von Effektor-T-Zellen supprimieren als wildtyp regulatorische T-Zellen. Dabei ist die Apoptose der Effektor-T-Zellen nicht von „Todesrezeptoren“ wie Fas und Fas-Ligand abhängig⁹⁰. Auch Perforin-inkompetente regulatorische T-Zellen besitzen weniger Suppressionskapazität als regulatorische T-Zellen mit wildtyp Genom⁹¹. Neben der Suppression von Effektor-T-Zellen durch Apoptose-Induktion ist dieser Mechanismus auch für B-Zellen von Bedeutung⁹¹.

1.6.1.3. Suppression durch TGF- β

Versuchstiere, die kein TGF- β exprimieren können, entwickeln ein Autoimmunsyndrom mit multiplen monozytären Organinfiltraten. Suppression wird mithilfe von TGF- β durch Induktion eines regulatorischen Phänotyps bei Effektor-T-Zellen vermittelt (s. 1.5.2). Weiterhin werden Effektor-T-Zellen und natürliche Killerzellen von regulatorischen T-Zellen direkt über membrangebundenes TGF- β supprimiert^{92,93}. TGF- β hemmt hauptsächlich über SMAD3 die Expression von IFN- γ bei natürlichen Killerzellen⁹⁴. Die Produktion der zytotoxischen Proteine Granzym A und B durch natürliche Killerzellen ist nach Inkubation mit TGF- β gemindert⁹⁴. Ohne das Vorhandensein von auf regulatorischen T-Zellen membrangebunden exprimierten TGF- β ist die Vermittlung einer „infektiösen Toleranz“ nicht möglich^{92,95}. Die Expression von TGF- β ist nicht auf Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen beschränkt⁹⁶. Auch andere regulatorische T-Zellen supprimieren die Proliferation von Effektor-T-Zellen über membrangebundenes TGF- β ⁹⁷. Effektor-T-Zellen, deren TGF- β -Signalweg gestört ist, zeigen

keine Zeichen von gesteigerter Proliferation, reagieren jedoch nicht auf Suppression durch regulatorische T-Zellen⁹⁶.

1.6.2. Zellkontaktunabhängige Mechanismen

1.6.2.1. *Suppression durch Zytokin-Deprivation*

Auch unabhängig von Granzymen und Perforinen können regulatorische T-Zellen Apoptose bei Effektor-T-Zellen auslösen. Sie entziehen hierbei Effektor-T-Zellen Zytokine wie IL-2. Dabei sind sie umso effektiver, je mehr CD25 sie exprimieren. Dieser Mechanismus kann *in vitro* durch Zugabe von Zytokinen wie IL-2 und IL-7 verhindert werden. Zytokin-Deprivation ist abhängig von Bim, welches in den Zielzellen Caspaseaktivität induziert und somit proapoptotisch wirkt. Bim-inkompetente Effektor-T-Zellen sind *in vitro* und *in vivo* vor Apoptose geschützt. Regulatorische T-Zellen können im T-Zell-Transfer-Modell eine durch Bim-inkompetente T-Zellen ausgelöste Kolitis nicht verhindern⁹⁸.

1.6.2.2. *Suppression durch IL-10*

IL-10 wird u.a. von Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen, von Tr1-Zellen und Makrophagen exprimiert^{99,100}. Besonders regulatorische T-Zellen in Kompartimenten, die eng mit Kontaktflächen zur Umwelt assoziiert sind, wie die Lamina propria mucosae des Kolons, Lunge und Haut, produzieren IL-10¹⁰¹. Tiere, die ausschließlich in regulatorischen T-Zellen kein IL-10 exprimieren, entwickeln sich bis zur achten Lebenswoche normal. Danach entwickeln sie spontan eine Kolitis sowie peribronchiale monozytäre Infiltrate. Jedoch ist das Autoimmunsyndrom weniger stark ausgeprägt als bei Tieren, die an vollständiger IL-10-Defizienz leiden¹⁰¹. Im T-Zell-Transfer-Modell für Kolitis können wildtyp regulatorische T-Zellen eine Kolitis nicht verhindern, wenn sie zusammen mit einem neutralisierenden anti-IL-10-Antikörper gegeben werden. Dies wurde auch für das Ovalbumin-Asthma-Modell gezeigt¹⁰². Bei Applikation von IL-10-inkompetenten regulatorischen T-Zellen wird eine T-Zell-Transfer induzierte Kolitis gemildert, jedoch nicht vollständig verhindert. Die IL-10-Expression regulatorischer T-Zellen besitzt also eine wichtige Funktion für die Immunhomöostase. Sie kann von anderen IL-10 exprimierenden Zellen nur teilweise ersetzt werden¹⁰⁰. Die Bedeutung von IL-10 für die Immunhomöostase wurde auch für den Menschen nachgewiesen. So zeigten sich bei zwei nicht verwandten Familien mit besonders frühem Beginn von schwerer chronisch entzündlicher Darmerkrankung Mutationen im IL-10-Rezeptor-Gen. Dies führte zur Störung des IL-10-Signalweges und damit zum Mangel an STAT3 und zur vermehrten Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-6¹⁸.

1.6.2.3. Suppression durch IL-35

IL-35 ist ein Heterodimer aus dem Epstein barr virus induced gene Ebi 3 und IL-12 α und ist damit aus jeweils einem Teil der proinflammatorischen Interleukine-12 und -27 zusammengesetzt¹⁰³. Es wird vermehrt von regulatorischen T-Zellen exprimiert, wohingegen die Expression in Effektor-T-Zellen gering ist. Tiere, die einen Defekt im Ebi3- oder IL-12 α -Gen haben, leiden nicht an einem Autoimmunsyndrom. Trotzdem können Ebi3- oder IL-12 α -defiziente regulatorische T-Zellen eine Kolitis im T-Zell-Transfer-Modell nicht verhindern. Diese Diskrepanz könnte in einem Fehlen der proinflammatorischen Zytokine IL-12 und IL-27 bei Ebi3^{-/-} und IL-12 α ^{-/-} Tieren begründet sein. Substituiert man IL-35, so sind IL-35^{-/-} regulatorische T-Zellen in der Lage, eine T-Zell-Transfer-Kolitis zu verhindern. IL-35 scheint nur für murine regulatorische T-Zellen von Bedeutung zu sein¹⁰³. Humane regulatorische T-Zellen exprimieren Ebi-3 nicht in detektierbaren Mengen¹⁰⁴.

Weitere Suppressionsmechanismen regulatorischer T-Zellen wie Suppression durch cAMP¹⁰⁵, Adenosin¹⁰⁶, Hämoxygenase¹⁰⁷, Phospholipase A2-IIID¹⁰⁸ werden diskutiert.

1.7. Matrix assisted laser desorption ionisation-Time of flight-Massenspektromie (MALDI-TOF-MS): Bedeutung und Funktion

Matrix assisted laser desorption ionisation-Time of flight-Massenspektromie-Imaging (MALDI-TOF-MS-, kurz MALDI-Imaging) ist eine Methode zur Analyse der Proteinexpression von Geweben. Die zu untersuchende Probe wird zusammen mit einer Matrixsubstanz auf einen Träger, z.B. einen leitfähigen Glasobjektträger aufgebracht (Abbildung 2 A). Biomoleküle wie Peptide, Proteine und Lipide der Probe lösen sich in der Matrix. Diese kristallisiert aus. Die Probe wird mit einem UV-Laser bestrahlt (Abbildung 2 B). Die Energie des Lasers wird durch die Matrix absorbiert und auf die in ihr gelösten Moleküle übertragen. Dadurch werden die Biomoleküle ionisiert und desorbiert. Durch Wahl einer geeigneten Matrix gelingt dies auch für schlecht ionisierbare Moleküle wie Peptide und Proteine, die mit anderen massenspektrometrischen Methoden nicht analysierbar sind. Die Ionen werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt (Abbildung 2 C). Die Zeit bis zum Auftreffen auf einen Detektor (Time of flight, TOF) wird gemessen und ist bei gleicher Ladung allein von der Größe des Moleküls abhängig (Abbildung 2 D,E). Bei MALDI handelt es sich um eine sog. Soft-ionization-technique. Dies bedeutet, dass durch die Ionisierung die Moleküle nicht zerstört und nur sehr wenige Bruchstücke generiert werden. Die detektierten Massen können somit direkt der zu untersuchenden Substanz zugeordnet werden. Kleine Moleküle erreichen den Detektor früher als größere. Aus der Größe des Moleküls können mithilfe von Datenbanken Rückschlüsse auf die Art des Moleküls gezogen werden. Durch Abgleich mit der Position des Lasers zum Zeitpunkt der Bestrahlung kann die lokale Verteilung interessierender Moleküle im Gewebe dargestellt werden (Abbildung 2 F).

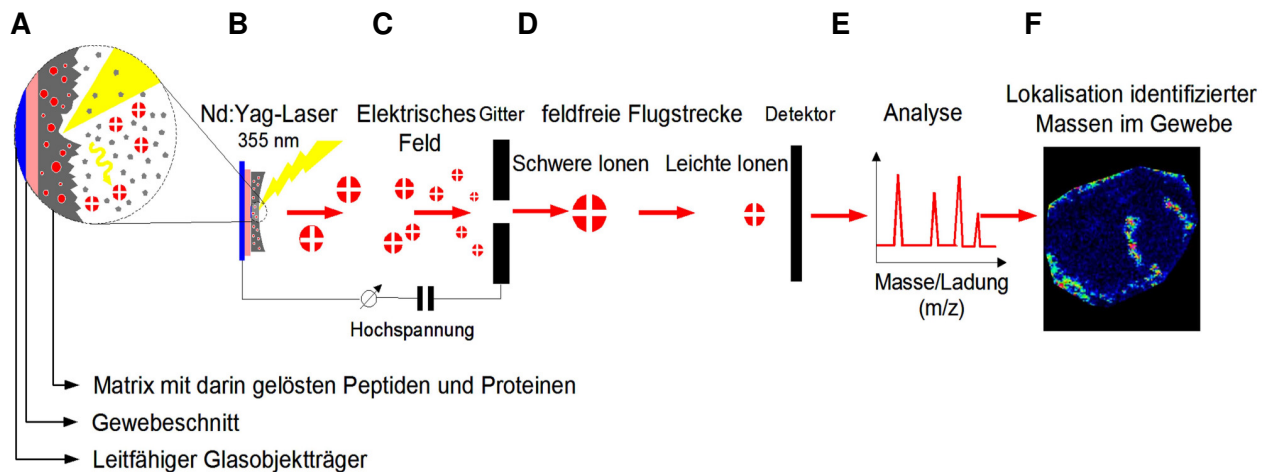


Abbildung 2 Schema der Funktionsweise von MALDI-TOF-MS-Imaging

A Das Gewebe wird auf einen leitfähigen Objektträger aufgebracht. Die im Gewebe exprimierten Biomoleküle lösen sich in der aufgetragenen Matrix. **B** Der Laser tastet die Probe rasterartig ab und bewirkt über die Matrix eine Ionisierung und Desorption der Proteine und Peptide. **C** Diese werden im elektrischen Feld beschleunigt. **D** Im feldfreien Vakuum trennen sich die Ionen nach ihrer Größe auf. Durch einen Detektor wird die Flugzeit der Ionen (time of flight) im Vakuum ermittelt. Schwere Ionen benötigen mehr Zeit, um den Detektor zu erreichen als leichtere. **E** Aus den Messwerten des Detektors werden mithilfe eines Computerprogrammes Massenspektren des untersuchten Gewebeareals errechnet. Sie werden mit den Informationen über die Position des Lasers bei der Ionisation der Biomoleküle abgeglichen. **F** Die lokale Verteilung von Biomolekülen einer bestimmten Größe in verschiedenen Gewebearealen lässt sich als Bild darstellen. Abbildung modifiziert nach und mit freundlicher Erlaubnis von Herrn Dr. habil. Schiller, Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Universität Leipzig.

Ein häufiges Ziel der Nutzung von MALDI-Imaging ist die Identifikation von Biomolekülen, die spezifisch in histologisch unterscheidbaren Gewebearealen wie z.B. in entzündlich verändertem Gewebe, Tumoren oder degenerativ veränderten Geweben vorkommen. Die Ergebnisse können zum Verständnis der Ätiologie von Krankheiten beitragen. Eine Nutzung von MALDI-Imaging für die Entwicklung von Screening-, Untersuchungs- und Behandlungsmethoden ist denkbar. So wurden Peptidexpressionsmuster gefunden, die eine Stadieneinteilung von Gliomen und sogar eine Aussage über die wahrscheinliche Überlebenszeit der Patienten zulassen¹⁰⁹. Ähnliche Ergebnisse konnten bei Prostata- und Ovarialkarzinomen erreicht werden. Die Analyse des Verteilungsmusters eines Moleküls mit bekannter Masse kann z.B. der Untersuchung der Pharmakokinetik und -dynamik eines bestimmten Medikaments dienen^{110,111}. Es gibt zwei wichtige Vorteile von MALDI-Imaging. Zum einen bleibt der Zellverband im Gewebe erhalten. Es ist also möglich, die Expression bestimmter Proteine und Peptide mit bestimmten Gewebearealen oder Zellen zu verknüpfen. Zum anderen ist es nicht nötig, die Art oder Größe eines Proteins im Vorhinein zu kennen. Damit eignet sich die Methode besonders zur Feststellung von Unterschieden zwischen mehreren Gewebetypen¹¹². In dieser Arbeit soll mittels MALDI-Imaging die Proteinexpression Ki67⁺ proliferierender Einzelzellen in lymphoiden Geweben untersucht werden.

1.8. Zielstellung

Folgende Ziele sollen in der vorliegenden Promotionsarbeit erreicht werden:

1. Webster et. al⁶² wiesen eine Expansion regulatorischer T-Zellen in lymphatischen Organen von mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Versuchstieren nach. In der vorliegenden Arbeit sollen Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen in lymphatischen Geweben und im Kolon von Versuchstieren durch Applikation von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex präferentiell expandiert werden. Die Expansion soll dabei mittels Durchflusszytometrie nach Färbung von CD4, CD25 und Foxp3 an Milzzellen sowie Zellen der mesenterialen Lymphknoten behandelter Tiere evaluiert werden.
2. Um eine lokale Expansion regulatorischer T-Zellen in lymphoiden Follikeln und der Lamina propria mucosae des Kolons der behandelten Tiere nachzuweisen, sollen Gewebeproben nach Färbung von Foxp3 und CD4 mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Weiterhin soll nach Markierung von Ki67 untersucht werden, ob nach Gabe von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex regulatorische T-Zellen vermehrt proliferieren.
3. In proliferierenden Zellen lymphoider Follikel des Kolons von Versuchstieren konnte IL-2-mRNA nachgewiesen werden¹¹³. Mittels Matrix assisted laser desorption ionisation-Time of flight-Massenspektrometrie (MALDI)-Imaging soll IL-2 *in situ* in diesen Zellen auch auf Proteinebene detektiert werden. Zur Etablierung der Methode soll die Proteinexpression von lymphoiden Geweben wie Thymus, mesenterialen Lymphknoten und lymphoiden Follikeln mit der von nicht-lymphoiden Geweben wie Tunica mucosa und Bindegewebe von Ileum und Zäkum der Versuchstiere verglichen werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Versuchstiere

Es wurden wildtyp Tiere des Stammes C57BL/6J (IL-2/anti-IL-2-Antikörperexperiment) bzw. BALB/c (Vorexperiment) über das Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI in Leipzig bezogen. Alle Tiere waren weiblich und zwischen neun und zwölf Wochen alt. Sie wurden unter SPF-Bedingungen gehalten. Die Experimente wurden gemäß den Leitlinien für tierexperimentelle Forschung der Universität Leipzig durchgeführt. Ein genehmigter Tierversuchsantrag liegt vor.

2.2. IL-2/IgG2b-Fusionsprotein-Vorexperiment

2.2.1. Induktion von 2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS)-Kolitis

Die Tiere wurden mit einer Mischung aus 100µl 2% Xylazin (Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen, Deutschland) und 100µl 10% Ketamin (Ketavet, Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) in sterilem PBS (phosphate buffered saline, Lonza AG, Verviers, Belgien) durch intraperitoneale Injektion anästhesiert. Zur Induktion der TNBS-Kolitis wurde das Protokoll von Stallmach et al. modifiziert¹¹⁴: Das Hapten TNBS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) wurde mit 50% Ethanol (Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande) gemischt, so dass eine 1% TNBS-Lösung entstand. Ein 4F Nabelvenenkatheter wurde rektal vorsichtig bis ca. 4cm ab ano eingeführt. Mittels einer 1ml Spritze wurden 100µl des TNBS-Ethanol-Gemischs appliziert. Danach wurden die Tiere etwa 30s vertikal gehalten, um ein Herauslaufen der TNBS-Lösung zu verhindern.

2.2.2. Durchführung des IL-2/IgG2b-Fusionsprotein-Vorexperimentes

Vorbereitung des Fusionsproteins bzw. der Isotyp-Kontrolle: Frau Prof. Dr. Silvia Bulfone-Paus, Abteilung Immunologie des Forschungszentrum Borstel, Deutschland stellte freundlicherweise IL-2/IgG2b-Fusionsprotein zur Verfügung. Es enthielt ein geringes Endotoxinlevel und war frei von Natriumazid. Es wurde aliquotiert und bis zur Benutzung bei -30°C aufbewahrt. Die ebenfalls natriumazidarme murine IgG2b-Isotyp-Kontrolle wurde von eBioscience Inc., San Diego, USA bezogen.

Applikation: Jeweils neun Mäuse wurden mit IL-2/IgG2b-Fusionsprotein bzw. mit Isotyp-Kontrolle behandelt. Eine intraperitoneale Injektion von 8µg IL-2/IgG2b-Fusionsprotein bzw. Isotyp-Kontrolle in 200µl sterilem PBS erfolgte erstmals 24h vor Applikation von TNBS. Sie wurde alle 12h wiederholt. Die Tiere wurden 2mal täglich gewogen. Am siebenten Tag nach Induktion der TNBS-Kolitis wurde das Experiment beendet.

2.3. Durchführung des IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex-Experiments

Vorbereitung des Antikörpers bzw. der Isotyp-Kontrolle: 1µg rekombinantes Maus-IL-2 stabilisiert mit 1% bovinem Serumalbumin (eBioscience) pro Maus und Tag wurden mit jeweils 5µg endotoxinarmem und natriumazidfreiem anti-Maus IL-2-Antikörper (Klon JES6-1, eBioscience) gemischt, für 30min bei 37°C inkubiert und bis zur Benutzung bei -80°C gelagert. Als Isotyp-Kontrolle wurde 5µg endotoxinarmes, natriumazidfreies Maus IgG2a (eBioscience) pro Maus und Tag genutzt.

Applikation: Sowohl die Behandlungs- als auch die Kontrollgruppe enthielt jeweils fünf Tiere. Am Tag der Benutzung wurde der IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex vorsichtig aufgetaut, mit 300µl sterilem PBS pro Tier gemischt und bis zur Applikation auf Eis gekühlt. Die IgG2a-Isotyp-Kontrolle wurde ebenfalls mit 300µl sterilem PBS gemischt und auf Eis gekühlt. Die Applikation erfolgte intraperitoneal an Tag 0, 1 und 2. Unbehandelte Kontrollen erhielten keine Injektion. Die Tiere wurden einmal täglich gewogen. Das Experiment wurde an Tag fünf beendet.

2.4. Durchflusszytometrie

Zellpräparation: Den Versuchstieren wurden Milz und mesenteriale Lymphknoten (MLN) entnommen, makroskopisch sichtbares Bindegewebe wurde entfernt und die vollständigen Organe (bei MLN 2-3) durch ein Zellsieb in steriles PBS gestrichen. Dies geschah mit gekühlten Reagenzien auf Eis. Die Zellsuspensionen wurden 8min bei 1200rpm (entspricht ca. 400g) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Daraufhin wurden mit jeweils 30ml Erythrozytenlysepuffer (0,82% (w/v) NH_4Cl , 0,1% (w/v) KHCO_3 , 0,0037% (w/v) EDTA in destilliertem Wasser) verunreinigende Erythrozyten lysiert. Die Inkubationszeit betrug 10min. Die Zellen wurden wieder 8min bei 1200rpm zentrifugiert und in jeweils 1000µl PBS resuspendiert. Hierauf erfolgte die Bestimmung der Zellzahl der Suspensionen in einer Neubauer-Zählkammer. Jeweils 5×10^5 Zellen wurden mit 2ml PBS, welches mit 1% (v/v) fetalem Kälberserum sowie 0,1% (v/v) Natriumazid versetzt war (Fluorescence activated cell sorting (FACS)-Puffer), gemischt und 5min bei 2000rpm (entspricht ca. 1200g) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen erneut in 50µl FACS-Puffer resuspendiert. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Zellen mit anti-CD16- und anti-CD32-Antikörpern 30min bei einer Temperatur von 4°C inkubiert (Fc-Block). Zum Waschen wurde 2ml FACS-Puffer zugegeben und es erfolgte 5min Zentrifugation bei 2000rpm und 4°C. Der Überstand wurde abermals verworfen und die Zellen in 50µl FACS-Puffer resuspendiert. Hierauf erfolgte die Färbung der Oberflächenmarker CD25 und CD4. CD19 wurde als Marker für die Kompensation der Messungen verwendet. Außerdem wurden die Isotyp-Kontrollen der Oberflächenmarker den

jeweiligen Kontrollen zugegeben. Die Inkubationszeit betrug 30min bei 4°C und in Dunkelheit. Hierauf folgte ein 2maliges Waschen in jeweils 2ml FACS-Puffer, Zentrifugation bei 2000rpm bei 4°C und Verwerfen des Überstandes. Zur Färbung des intrazellulären Markers Foxp3 wurden die Zellen nun in 1000µl Fixations-/Permeabilisationspuffer (Foxp3 staining set, eBioscience) resuspendiert und 1h bei 4°C und in Dunkelheit inkubiert. Nach 2maligem Waschen in jeweils 2ml des nach Herstellerangaben verdünnten Permeabilisationspuffers wurden die Zellen in 50µl des gleichen Puffers resuspendiert und freie Fc-Bindungsstellen erneut blockiert (Fc-Block, Inkubationszeit 15min bei 4°C). Daraufhin wurde ohne weiteres Waschen der Foxp3-Antikörper bzw. die Isotyp-Kontrolle zugegeben. Die Inkubationszeit betrug 30min bei 4°C in Dunkelheit. Nach abschließendem 2maligem Waschen in Permeabilisationspuffer und Zentrifugation bei 1200rpm und 4°C wurden die Zellen in 500µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Messung erfolgte im Durchflusszytometer Cytomics FC500 (Beckmann-Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland).

Tabelle 1: Antikörper und Isotyp-Kontrollen Durchflusszytometrie

Antikörper und Isotyp-Kontrollen	Konzentration	Hersteller
Rat anti-mouse-CD16/CD32 (Fc-Block)	1:25	BD Biosciences Inc., Franklin Lakes, USA
Rat IgG2a-APC (Isotyp)	1:25	Beckman Coulter Inc., Brea, USA
Rat IgG2a-FITC (Isotyp)	1:25	Beckman Coulter Inc., Brea, USA
Rat IgG2a-PE (Isotyp)	1:25	Beckman Coulter Inc., Brea, USA
Rat anti-mouse-CD19-PE	1:25	Beckman Coulter Inc., Brea, USA
Rat anti-mouse-Foxp3-PE	1:100	NatuTec GmbH, Frankfurt, Deutschland
Rat anti-mouse-CD25-APC	1:25	NatuTec GmbH, Frankfurt, Deutschland
Rat anti-mouse CD4-FITC	1:25	NatuTec GmbH, Frankfurt, Deutschland

2.5. Histologische Färbungen

2.5.1. Probenvorbereitung

Die Gewebe wurden in Tissue-Tek Kryoeinbettmedium (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande) eingebettet und mit Hilfe von 2-Methylbutan (Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande) und Trockeneis kryofixiert. Sie wurden bei -22°C mittels Kryotom (Cryo-Star HM 560 M, Microm international GmbH, Walldorf, Deutschland) 6µm dick geschnitten und auf Glasobjektträger (Superfrost Plus, Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht. Bei Raumtemperatur wurden die Präparate über Nacht luftgetrocknet und dann bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.5.2. Hämatoxylin/Eosin (HE) Färbung

Die Gewebeschnitte wurden 3min in Hämatoxylin-Lösung (Carl Roth GmbH, Braunschweig, Deutschland) inkubiert, 10min in Leitungswasser gebläut und eine Minute in Eosin (Carl Roth GmbH) gegengefärbt. Daraufhin wurden sie in aufsteigender Ethanolreihe von 70% über 96% und 99,5% Ethanol (Mallinckrodt Baker B.V.) bis zum Xylol (Mallinckrodt Baker B.V.) geführt und so entwässert. Zur Einbettung der Gewebeproben wurde Entellan-Einbettmedium (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) auf Xylolbasis benutzt.

2.5.3. Immunfluoreszenz-Färbungen

Mittels Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Antigene Foxp3, Ki67 und CD4 nachgewiesen und lokalisiert. Alle Immunfluoreszenzfärbungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Wasch- (pH 7,56) und Verdünnungsmedium (pH 7,25) diente TBS-Puffer (Tris buffered saline; 0.05M Tris Base, Carl Roth GmbH in 0,9% NaCl). Die Gewebeschnitte wurden mit 4% Paraformaldehydlösung (4g Paraformaldehyd, Carl Roth GmbH, Braunschweig, Deutschland in 100ml PBS, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland) für 5min fixiert. Anschließend wurde die endogene Peroxidase durch Inkubation mit 3% H₂O₂-Lösung (Carl Roth GmbH) für 3x 5min abgesättigt. Die Maskierung unspezifischer Bindungsstellen für Antikörper erfolgte durch 30minütige Inkubation in 5% Eselserum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland). Hierauf erfolgte die Inkubation mit Foxp3-Primärantikörper (monoklonal Ratte anti-Maus/Ratte Foxp3, Klon FJK-16s, Verdünnung 1:50, eBioscience Inc.) in 2% Eselserum für 30min. Sekundärantikörper war ein monoklonaler mit Meerrettichperoxidase konjugierter Esel anti-Ratte IgG-Antikörper (Esel anti-Ratte IgG, Verdünnung 1:100, Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA). In diesem wurden die Gewebeproben 30min inkubiert. Das Signal wurde, je nach Anforderung, mit Cyanine (Cy)3, Fluoresceinisothiocyanat (FITC) oder Cy5 konjugiertem Tyramid (PerkinElmer Inc., Waltham, USA) für 15min amplifiziert. Zur Färbung von CD4 wurde der Gewebeschnitt mit AlexaFluor 647-konjugiertem anti-CD4-Antikörper (monoklonal Ratte anti-Maus CD4, Klon RM4-5, Konzentration 1:100, Konjugat AlexaFluor 647, BioLegend Inc., San Diego, USA) 30min lang inkubiert. Ki67 wurde nach nochmaliger Absättigung der Peroxidaseaktivität mittels 3x 5min Inkubation in 3% H₂O₂-Lösung sowie 1x 10min in Natriumazid gefärbt. Es folgte die Maskierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen mit 5% Mausserum (AbD serotec, Düsseldorf, Deutschland). Monoklonaler, mit FITC gelabelter anti-Human Ki67-Antikörper (monoklonal Maus anti-Human Ki67, Klon B56, konjugiert mit FITC, Verdünnung 1:50, BD Biosciences Franklin Lakes, USA) ist mit murinem Ki67 kreuzreaktiv. Er wurde in 2% Mausserum gelöst, seine Inkubationszeit betrug 30min. Als Sekundärantikörper diente Meerrettichperoxidase-konjugierter Maus anti-FITC-Antikörper (Maus anti-FITC, konjugiert

mit HRP, Konzentration 1:200, Jackson ImmunoResearch). Durch 15min Inkubation mit Tyramid-FITC wurde eine Fluoreszenzmarkierung erreicht. Die Kerngegenfärbung erfolgte mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in einer Konzentration von 1:2000 für 2min. Kontrollfärbungen erfolgten jeweils ohne den genannten Primärantikörper.

2.5.4. Ki67-Schnellfärbung

Um durch kurze Färbe- und Waschzeiten den Verlust und die laterale Diffusion von Proteinen möglichst gering zu halten, wurde für MALDI-Imaging eine Ki67-Schnellfärbung etabliert. Dafür wurde eine von Dr. Norman Händel (Universität Leipzig, Klinik und Poliklinik für Kinder und Jugendliche) und Mario Heindl entwickelte Färbung leicht modifiziert. Nach 3minütiger Fixierung in 70% Ethanol bei -40°C und kurzem Waschen in gekühltem PBS wurden die Organschnitte 3min in 10% FITC-konjugiertem anti-Human/Maus Ki67-Antikörper inkubiert. Dieser wurde nach kurzem Waschen mittels eines Meerrettichperoxidase-konjugierten Maus anti-FITC-Antikörpers (10%, 3min) und dem Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) nachgewiesen. Alternativ wurde der Schnitt nach Inkubation mit anti-Ki67-Primärantikörper 3min mit einem Biotin-gelabelten anti-FITC-Antikörper (monoklonal Maus anti-FITC, Klon 1F8-1E4, Verdünnung 1:10, Konjugat Biotin, Jackson ImmunoResearch) und anschließend weitere 3min mit Streptavidin (Streptavidin, Verdünnung 1:10, unkonjugiert, Jackson ImmunoResearch) inkubiert. Zur Feststellung der Spezifität der Färbung wurde Meerrettichperoxidase-konjugiertes Streptavidin (Streptavidin, Verdünnung 1:10, HRP-konjugiert, Jackson ImmunoResearch) genutzt und mit DAB gefärbt.

2.5.5. Mikroskopie und Photographie

Für die histologische Auswertung von HE-gefärbten Gewebeschnitten wurde das Mikroskop Olympus CX41 (Olympus Europa GmbH, Hamburg, Deutschland) mit einem Olympus Plan CN (10x/0,25 bzw. 20x/0,4) Objektiv genutzt. Für die photographische Aufnahme HE-gefärbter Schnitte sowie die Beurteilung von fluoreszenzgefärbten Gewebeschnitten wurde das Mikroskop Keyence BZ-8000 (Keyence Corporation, Osaka, Japan) sowie das Objektiv Plan Apo (20x/0,75) verwendet. Dabei wurden folgende Filter genutzt: DAPI (460/50), Cy3 (630/60), Cy5 (620/60), FITC (470/40). Die Vergrößerung wurde für HE-Färbungen 100-fach bzw. 200-fach und für Immunfluoreszenzfärbungen 200-fach gewählt.

2.6. Histologische Auswertungen

2.6.1. Kolitis-Score

Für die Beurteilung von HE-gefärbten Kolonschnitten wurde ein von Read et al.¹¹⁵ entwickelter Kolitis-Score geringfügig modifiziert. Es fließen sieben Kriterien ein: Kryptenverlängerung, Becherzellverlust, Infiltrat der Lamina propria mucosae, Epithelschäden, Abszessbildung, Infiltrat der Tela submucosa, Ödem der Tunica muscularis. Für jedes Kriterium wurde eine maximale Punktzahl von 2 festgelegt. Es wird die Stärke der Ausprägung des jeweiligen Merkmals und seine Ausdehnung im Gewebe berücksichtigt.

Dabei bedeutet ein Punktwert von:

- 0,5: Auftreten des Kriteriums in geringem Maße an wenigen Stellen des Gewebeschnittes
- 1,0: Auftreten des Kriteriums in geringem Maße in 30-100% des Gewebeschnittes oder in ausgeprägtem Maße an wenigen Stellen
- 1,5: Auftreten des Merkmals in ausgeprägtem Maße in etwa der Hälfte des Gewebeschnittes
- 2,0: Auftreten des Merkmals in ausgeprägtem Maße in mehr als der Hälfte des Gewebeschnittes

Ein Kolongewebeschnitt, bei dem keines der genannten Kriterien zutrifft, erhält damit einen Score-Wert von 0 Punkten. Treffen alle Merkmale in voller Ausprägung zu, kann ein Wert von 14 Punkten erreicht werden. Von einer relevanten Entzündung ist ab einem Score-Wert von 4 auszugehen. Die Bestimmung des Score-Wertes erfolgte in verblindeter Form.

2.6.2. Bildanalyse

Es wurden Immunfluoreszenzfärbungen von Lamina propria mucosae und lymphoiden Follikeln des Kolons untersucht. Die Auswertung der Lamina propria mucosae erfolgte mithilfe der Software SigmaScan Pro 5 (Systat Software Inc., San Jose, USA). Die jeweiligen Zellen wurden manuell markiert und automatisch gezählt. Gewebeflächen wurden mit der Software Spot Advanced 3.2.1 (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA) bestimmt. Eine Strecke von 100µm entspricht dabei 310 Pixeln. Ein Bild, das mit 200-facher Vergrößerung aufgenommen wurde, hat eine Gesamtfläche von 144100µm².

2.6.2.1. Automatische Bildanalyse mittels der Software CellProfiler

Die Analyse der Immunfluoreszenzaufnahmen der lymphoiden Follikel erfolgte mittels der Analysesoftware CellProfiler (Thouis E. Jones, Anne E. Carpenter, www.cellprofiler.org). Sie ermöglicht eine zeitsparende automatische Analyse von Zellzahlen und Assoziationen verschiedener Zelltypen. Zunächst wurden mithilfe des Programms Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, San Jose, USA) interessante Bildregionen manuell ausgewählt (Abbildung

3 A). Hierauf erfolgte eine manuelle Optimierung der Signalstärke der Objekte im Verhältnis zum Hintergrund. Das resultierende Bild wurde in die Software CellProfiler geladen. Die Analyse erfolgt durch mehrere Module, etwa Bildbearbeitung, Objektidentifizierung und Messung, die zu einem bestimmten Ablauf, der sogenannten Pipeline zusammengefügt werden. Die meisten Vorgänge sind automatisiert, der Nutzer kann aber selbst eingreifen und Parameter verändern¹¹⁶. Zunächst wird das Bild in einzelne Farbkanäle zerlegt, diese werden als Graustufenbild ausgegeben (Abbildung 3 B). Hierauf erfolgt die Identifikation der Zellen (Abbildung 3 C). Zuerst werden größere Zellkonglomerate identifiziert. Diese werden z.B. auf Grundlage von Helligkeitsunterschieden in Einzelzellen unterteilt. Zuletzt werden einige der aus der Unterteilung resultierenden Objekte aufgrund z.B. ihrer geringen Größe von der Analyse ausgeschlossen¹¹⁶. Der Nutzer kann dies durch Angabe der Mindestgröße der zu identifizierenden Objekte (Zellen bzw. Zellkerne) beeinflussen. An die Identifikation der Objekte schließen sich komplexe Analysen wie die Ermittlung der Zelldichte („Nachbarzellen“), die Zahl der Zellkontakte zwischen Ki67⁺ und Foxp3⁺ Zellen sowie der Zahl Ki67⁺Foxp3⁺ Zellen an (Abbildung 3 D). Es wurde eine von Händel et al. erarbeitete Pipeline verwendet¹¹⁷. Die optimalen Einstellungen für die Größe der zu identifizierenden Objekte wurden experimentell ermittelt (s.a. Kapitel 2.6.3). Zellkerne werden am genauesten bei einer Größe von 9,6 bis 50 Pixeln identifiziert, Foxp3⁺ Zellen zwischen 14,5 und 50 Pixeln, Ki67⁺ zwischen 12,5 und 50 Pixeln. Die Nachbarzellen Foxp3⁺ Zellen ermittelt CellProfiler durch den Vergleich des Graubildes der Zellkerne (Abbildung 3 C, blau) mit dem der identifizierten Foxp3⁺ Zellen (Abbildung 3 C, rot). Kontakte zwischen Foxp3⁺ Zellen und Ki67⁺ Zellen wurden detektiert, indem Foxp3⁺ Zellen um fünf Pixel expandiert wurden und nach Überlappungen mit Ki67⁺ Zellen gesucht wurde. Fünf Pixel entsprechen 1,6µm und damit in etwa dem Abstand, bei dem bei manueller Zählung noch von einem Kontakt auszugehen ist¹¹⁷. Da die Identifikation der Zellkontakte somit auf der Überlappung von Zellen beruht, ist es auf diese Art nicht möglich, diese von Foxp3⁺Ki67⁺ Zellen abzugrenzen. Zur Identifikation von Foxp3⁺Ki67⁺ Zellen wird das Graustufenbild Ki67⁺ Zellen vom Graustufenbild Foxp3⁺ Zellen subtrahiert. Es resultiert ein Bild, das nur Zellen zeigt, die nicht Foxp3⁺Ki67⁺ sind. Dieses Zwischenbild wird wiederum vom Graustufenbild Foxp3⁺ Zellen subtrahiert. Das resultierende Bild zeigt damit nur Foxp3⁺Ki67⁺ Zellen¹¹⁷. Die Ergebnisse wurden in eine Excel-Tabelle (Microsoft Corporation, Redmond, USA) exportiert.

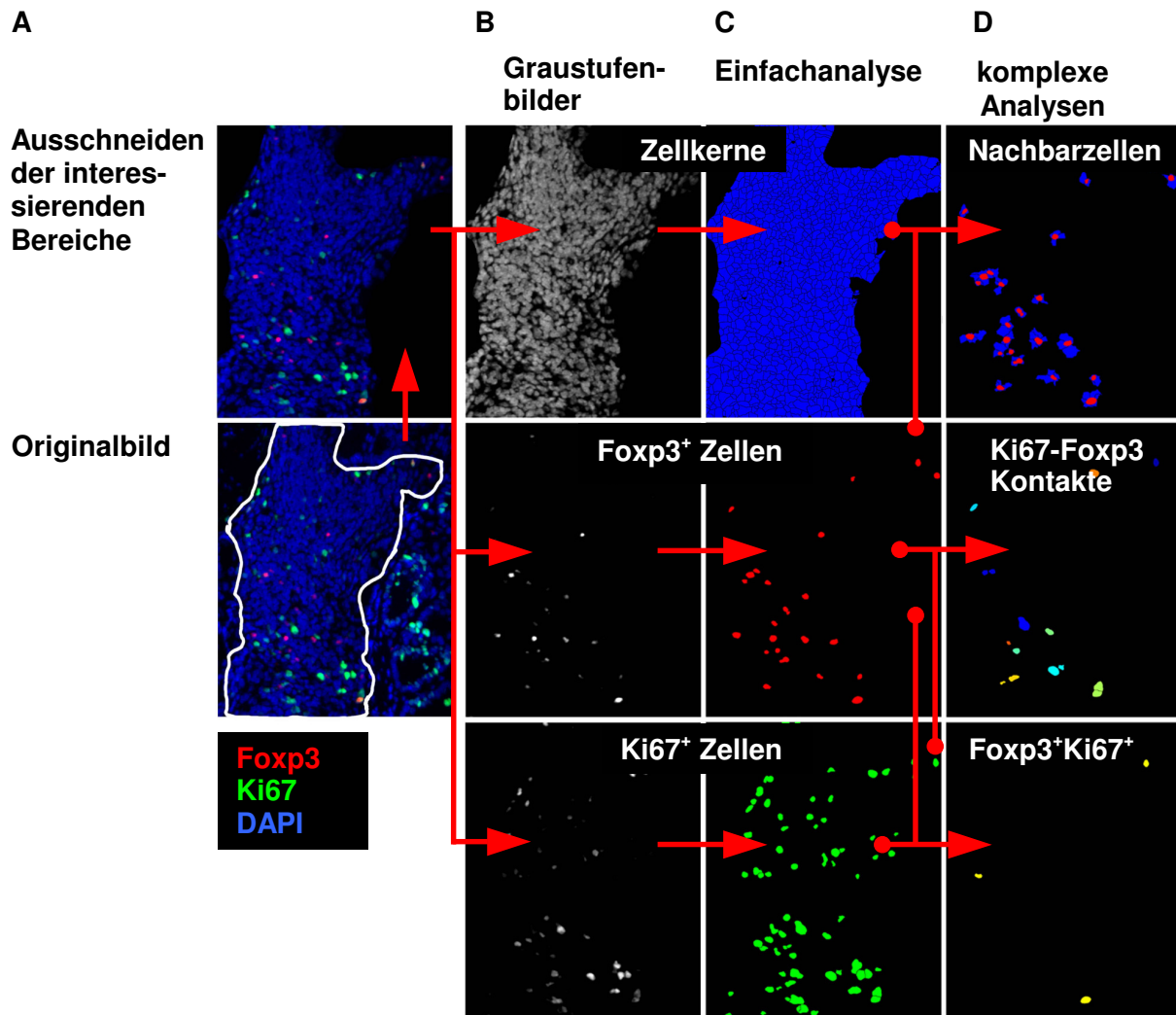


Abbildung 3 Schema der Bildanalyse mittels CellProfiler

A Das zu untersuchende Bild wird mittels eines Bildbearbeitungsprogramms vorbereitet, nicht interessierende Bereiche werden abgeschnitten, der Kontrast von Objekten zum Hintergrund wird eventuell verstärkt. **B** Das resultierende Bild wird in die Bildanalysesoftware CellProfiler geladen. Diese zerlegt es in Farbkanäle, die jeweils in einem Graustufenbild dargestellt werden (oben DAPI⁺ Zellkerne, mittig Foxp3⁺, unten Ki67⁺). **C** In den Graustufenbildern werden einzelne Zellen identifiziert, hier als Einfachanalyse bezeichnet (oben DAPI⁺, blau; mittig Foxp3⁺, rot; unten Ki67⁺, grün). **D** Mit den derart generierten Bildern können komplexe Analysen vollzogen werden. Aus DAPI⁺ Zellkernen und Foxp3⁺ Zellen ergibt sich die Zahl der mit Foxp3⁺ Zellen benachbarten Zellen (Nachbarzellen, oben). Aus der Analyse der Überlappungen mit Ki67⁺ Zellen nach Expansion Foxp3⁺ Zellen ergibt sich die Zahl der Zellkontakte zwischen Foxp3⁺ Zellen und Ki67⁺ Zellen (Mitte). Die Zahl Foxp3⁺Ki67⁺ Zellen resultiert ebenfalls aus weiterer Analyse der Bilder Foxp3⁺ und Ki67⁺ Zellen (unten).

2.6.3. Validierung der automatischen Bildanalyse mittels CellProfiler

Zur Auswertung der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente sollten u.a. mikroskopische Aufnahmen von lymphoiden Follikeln des Kolons von Versuchstieren nach Immunfluoreszenzfärbung analysiert werden. Dazu sollte die Bildanalysesoftware CellProfiler (s. Kapitel 2.6.2.1) verwendet werden. Zur Validierung wurden die durch CellProfiler ermittelten Daten mit den Ergebnissen manueller Bildanalyse verglichen. Dazu wurden insgesamt 26 Bilddateien ausgewertet. In die Analyse gingen ein 26367 DAPI⁺ Zellkerne, 595 Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen, 1465 Ki67⁺ proliferierende Zellen, 301 Kontakte

zwischen Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen und Ki67⁺ proliferierenden Zellen, 2139 Nachbarzellen Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen und 75 Ki67⁺Foxp3⁺ proliferierende regulatorische T-Zellen. CellProfiler detektierte 26538 DAPI⁺ Zellen, 583 Foxp3⁺ Zellen, 1487 Ki67⁺ Zellen, 346 Kontakte zwischen Foxp3⁺ und Ki67⁺ Zellen, 2015 Nachbarzellen Foxp3⁺ Zellen und 75 Ki67⁺Foxp3⁺ Zellen.

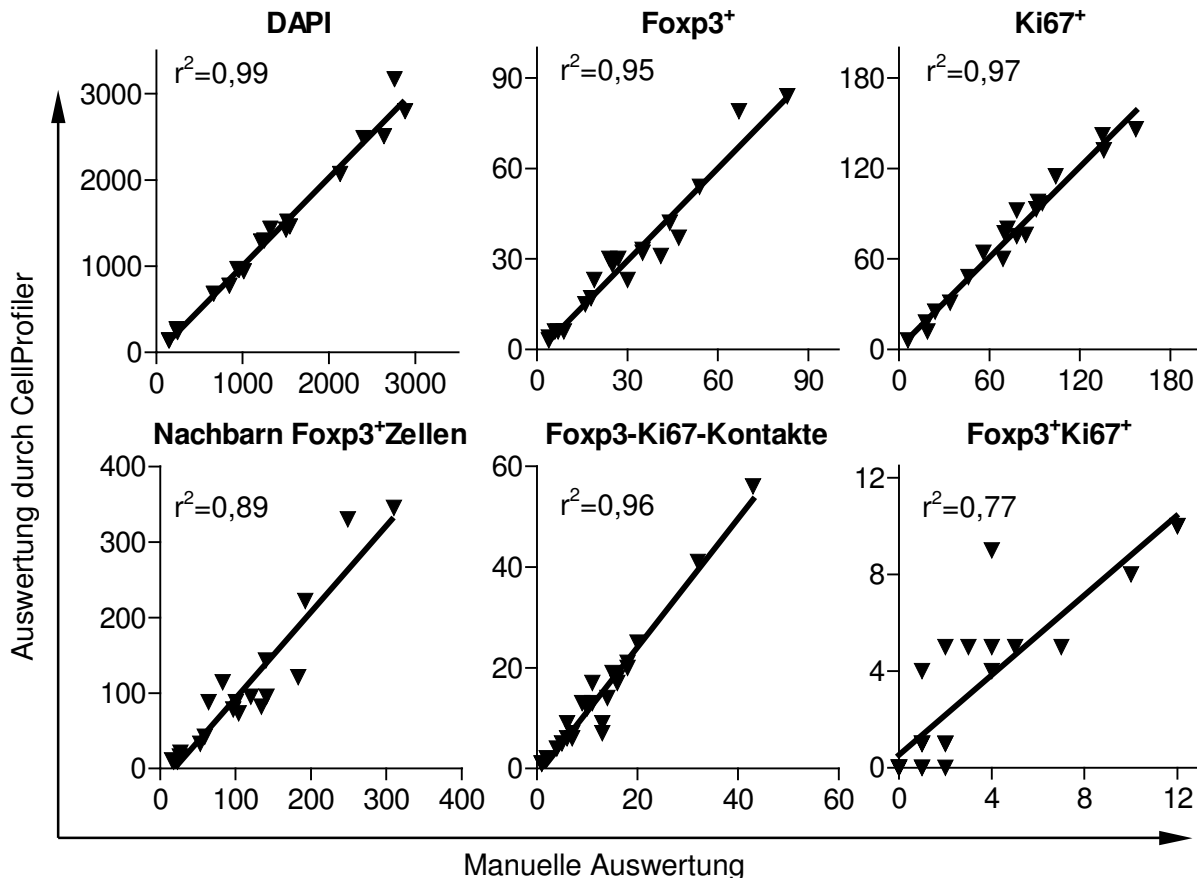


Abbildung 4 Durch CellProfiler ermittelte Bildanalysedaten sind mit Daten manueller Bildanalyse vergleichbar.

Es wurden 26 Bilddateien sowohl manuell als auch mit der Bildanalysesoftware CellProfiler ausgewertet. Auf der X-Achse dargestellt sind die Ergebnisse der manuellen Bildanalyse für Zellkerne (DAPI), Foxp3⁺ Zellen, Ki67⁺ Zellen, Nachbarzellen Foxp3⁺ Zellen, Kontakte zwischen Ki67⁺ Zellen und Foxp3⁺ Zellen und Foxp3⁺Ki67⁺ Zellen. Auf der Y-Achse sind jeweils die Werte der automatischen Bildanalyse mittels CellProfiler aufgetragen. Angegeben sind die Korrelationskoeffizienten r^2 nach Pearson.

Im Mittel beträgt die Abweichung der automatischen Zählung von der manuellen Zellzählung für die einzelnen Bilder bei Basisanalysen <1% bei Zellkernen; 4,2% bei Foxp3⁺ Zellen und <1% bei der Analyse Ki67⁺ Zellen. Die durchschnittlichen Abweichungen der einzelnen ausgewerteten Bilddateien bei komplexen Analysen sind höher. Sie betragen bei der Analyse der Nachbarzellen Foxp3⁺ Zellen 16,0%; bei Foxp3-Ki67-Kontakten 10,0% und bei Foxp3⁺Ki67⁺Zellen 12,6%. Bei Zusammenfassung der Ergebnisse aller Bilder betrug die Abweichung der automatischen Analyse <1% bei Zellkernen; 2,0% bei Foxp3⁺ Zellen; 1,6%

bei Ki67⁺ Zellen; 5,8% bei Nachbarzellen Foxp3⁺ Zellen und 0% bei Foxp3⁺Ki67⁺ Zellen. Eine relevante Abweichung ergab sich mit 15,0% bei der Auswertung der Kontakte zwischen Foxp3⁺ und Ki67⁺ Zellen. Hier übersteigt die durch automatische Auswertung ermittelte Zahl die der manuellen. Bei keinem der Werte ergab sich eine signifikante Abweichung zwischen manueller und automatischer Analyse. Die Korrelation zwischen manueller und automatischer Analyse ist hoch (Abbildung 4). Die Korrelationskoeffizienten betragen für die Analyse der Zellkerne $r^2=0,99$; für Foxp3⁺ Zellen $r^2=0,95$; für Ki67⁺ Zellen $r^2=0,97$; für Nachbarzellen Foxp3⁺ Zellen $r^2=0,89$; für Kontakte zwischen Ki67⁺ und Foxp3⁺ Zellen $r^2=0,96$ und für Foxp3⁺Ki67⁺ Zellen $r^2=0,77$.

2.7. MALDI-Imaging

2.7.1. Probenvorbereitung für MALDI-Imaging

Wildtyp Mäusen des Stammes C57BL/6J wurden Thymus, Kolon, Zäkum sowie mesenteriale Lymphknoten entnommen. Die Organe wurden von Verunreinigungen und makroskopisch sichtbarem Bindegewebe befreit und ohne Einbettmedium in Einbetttschälchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dabei wurde ein direkter Kontakt von Gewebe und Stickstoff vermieden, um einer Zellschädigung entgegenzuwirken. Die Proben wurden bei -80°C aufbewahrt. Alle Organe wurden mittels eines Kryotoms (Leica CM 1900 UV, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) 9µm dick geschnitten. Sie wurden auf -20°C kalte, mit Indiumzinkoxid beschichtete und somit leitfähige Objektträger (Bruker Daltonics corporation, Billerica, USA) transferiert. Eine zusätzliche manuelle Beschichtung der Objektträger mit Polylysin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) versetzt mit dem Detergenz Nonidet 40 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) wirkte einer Ablösung der Proben entgegen. Hierauf erfolgte optional eine Ki67-Schnellfärbung detektiert mit DAB oder Streptavidin. Nach 2x 2min Waschen in 70% Ethanol und 1x 2min Waschen in 99,5% Ethanol wurden die Proben für mindestens 30min in einer Vakuumkammer getrocknet und bis zur Benutzung aufbewahrt. Die Objektträger wurden mittels des Gerätes SuperCoolscan 5000 (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) oder im Falle einer DAB-Färbung mit dem automatischen Mikroskopiersystem Mirax Scan (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) digitalisiert. Daraufhin wurde automatisiert 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (Sinapinsäure 10g/l, MALDI Matrix, Bruker Daltonics in 60% (v/v) Acetonitril, Sigma-Aldrich und 0,2% (v/v) Trifluoressigsäure, Sigma-Aldrich in destilliertem Wasser) als Matrix aufgebracht (Image Prep, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland). Die Größe der Matrixtropfen wird vom Hersteller mit durchschnittlich 20µm angegeben.

2.7.2. Analyse der Peptidexpression in Gewebeschnitten mittels MALDI-Imaging

Die Analyse der Proben erfolgte in einem Autoflex III Massenspektrometer (Bruker Daltonik GmbH), welches mit einem Smartbeam II Laser ausgerüstet war. Hierbei handelt es sich um einen modulierten Nd:Yag- (Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat)-Laser. Die Wellenlänge des Lasers beträgt 355nm. Der Laserdurchmesser betrug bei der Analyse von Gewebearealen 30µm, bei Einzelzellanalysen 10µm. Die Laserfrequenz betrug 200 Hz. Der Abstand zweier Messpunkte betrug ca. 10µm. Das Spektrum eines Gewebepunktes wurde aus der Summation von jeweils 200 Einzelanalysen bestimmt. Das Gerät wurde mithilfe der Software FlexImaging (Bruker Daltonik) bedient. Zur Auswertung der Daten wurden die Programme FlexImaging und ClinPro Tools (Bruker Daltonik) verwendet. Relevante Proteinmassen wurden mithilfe der frei zugänglichen Proteindatenbank-Suchinstruments MS-Fit (Baker, P.R. und Clauser, K.R. <http://prospector.ucsf.edu>) und den Datenbanken SwisProt.2010.03.30 sowie Protein knowledge base (UniProtKB, <http://www.uniprot.org>) abgeglichen.

2.8. Statistische Auswertungen

2.8.1. Statistische Tests

Zur statistischen Auswertung wurden die Programme Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) verwendet. Es wurde nicht von einer Normalverteilung der Messwerte ausgegangen. Deshalb wurde der zweiseitige U-Test nach Mann und Whitney verwendet. Konfidenzintervalle wurden mit der Formel nach Wald berechnet. P-Werte von $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angenommen. In den dargestellten Grafiken wurde der Median durch eine horizontale Linie dargestellt. Die Korrelation der durch CellProfiler vorgenommenen Bildanalyse mit manuell erhobenen Daten wurde durch lineare Regression nach Pearson vorgenommen.

2.8.2. Berechnung der zu erwartenden Zahl von Kontakten zwischen Ki67⁺ und Foxp3⁺ Zellen

Es sollten direkte Zell-Zell-Interaktionen zwischen Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen und Ki67⁺ proliferierenden Zellen charakterisiert werden. Es wurde davon ausgegangen, dass Zellen überzufällig oft in Kontakt miteinander sind, wenn dies von funktioneller Bedeutung ist. Dafür wurde ein von Händel et al. entwickeltes Modell benutzt, mit welchem die Wahrscheinlichkeit berechnet werden kann, mit der eine Foxp3⁺ Zelle in zufälligem Kontakt mit einer Ki67⁺ Zelle vorliegt¹¹⁷. Dabei werden berücksichtigt die (Zelldichte n) als Zahl der Zellen gleich welcher Art, die mit einer Foxp3⁺ Zellen benachbart sind und das Verhältnis Ki67⁺ Zellen a zur Gesamtzellzahl t (a/t)¹¹⁷. Die Wahrscheinlichkeit P eines zufälligen Zellkontaktes zwischen

einer Foxp3⁺ regulatorischen T-Zelle und einer proliferierenden Ki67⁺ Zelle beträgt demnach $P=1-(1-(a/t))^n$ ¹¹⁷.

3. Ergebnisse

In Vorexperimenten in Zusammenarbeit mit Dr. Jens Knauer (Fraunhoferinstitut für Zelltherapie und Immunologie IZI in Leipzig) wurde der Einfluss des IL-2-Rezeptoragonisten IL-2/IgG2b-Fusionsprotein auf den Verlauf einer mittels 2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS) induzierten Kolitis an Mäusen des Stammes BALB/c (n=9) untersucht. Kontrolltiere wurden mit Isotyp-Kontrolle behandelt (n=9). Bei der Untersuchung der Gewichtsentwicklung konnte kein Vorteil von mit IL-2/IgG2b-Fusionsprotein behandelten Versuchstieren gegenüber Isotyp-Kontrollen festgestellt werden ($p=0,43$). Die Überlebensrate war mit 4 von 9 Tieren in der Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe (6 von 9 Tieren) etwas, jedoch nicht signifikant erniedrigt. Bei der histologischen Auswertung von HE-gefärbten Gewebeschnitten des Kolons der Versuchstiere ließ sich mit einem Kolitis-Score-Wert (s. 2.6.1) von $3,7 \pm 1,3$ nach Behandlung mit IL-2/IgG2b-Fusionsprotein und $5,6 \pm 3,0$ nach Gabe von Isotyp-Kontrolle keine signifikante Minderung der Entzündungsaktivität durch das Verum ermitteln ($p=0,15$). Nach Immunfluoreszenzfärbung des Markers für regulatorische T-Zellen Foxp3 und des Proliferationsmarkers Ki67 wurde die Zahl regulatorischer T-Zellen pro mm^2 , sowohl in lymphoiden Follikeln als auch in der Lamina propria mucosae des Kolons bestimmt. Sie betrug nach Gabe von IL-2/IgG2b-Fusionsprotein in lymphoiden Follikeln $947,8 \pm 479,9$ regulatorische T-Zellen/ mm^2 , bei Isotyp-Kontrollen $757,1 \pm 344,2$ regulatorische T-Zellen/ mm^2 ($p=0,43$). In der Lamina propria mucosae des Kolons betrug die Zahl regulatorischer T-Zellen/ mm^2 $93,5 \pm 36,5$ regulatorische T-Zellen bei Tieren der Verumgruppe respektive $143,5 \pm 105,9$ regulatorische T-Zellen/ mm^2 bei Tieren der Kontroll-Gruppe ($p=0,53$). Der Anteil proliferierender regulatorischer T-Zellen wurde in beiden Kompartimenten bestimmt. Er ließ sich durch Gabe von IL-2/IgG2b-Fusionsprotein nicht steigern.

In den folgenden Experimenten wurde aufgrund dieser Ergebnisse nicht ein IL-2/IgG2b-Fusionsprotein sondern ein von Boyman et al.⁵⁹ vorgeschlagener IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex benutzt.

3.1. Design des IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex Experimentes

Die Expansion regulatorischer T-Zellen mittels IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex wurde bereits in mehreren Studien untersucht^{56,59,62}. Der Fokus lag dabei auf der Untersuchung der Auswirkungen der Expansion regulatorischer T-Zellen auf den Verlauf von respiratorischen und neurologischen Autoimmunsyndromen. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob durch IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex eine Expansion regulatorischer T-Zellen

lokal in lymphoiden Follikeln und der Lamina propria mucosae des Kolons von C57BL/6J Mäusen erreicht werden kann. Es wurden zwei unabhängige Experimente mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex durchgeführt. Die Ergebnisse der Experimente wurden zusammengefasst. Das Design der Experimente kann aus Abbildung 5 entnommen werden. IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex wurde an Tag 0, 1 und 2 intraperitoneal appliziert (rote Pfeile, n=10). Diese Tiere werden im Weiteren als Behandlungsgruppe bezeichnet. Als Kontrollen dienten mit IgG2a-Isotyp-Kontrolle behandelte (n=10) „Isotyp-Kontrolle“ bzw. unbehandelte Tiere (n=5) „unbehandelte Kontrolle“. Alle Tiere wurden täglich gewogen (x). Nach Beendigung des Experimentes an Tag 5 wurden mesenteriale Lymphknoten (MLN), Milz und Kolon entnommen.

IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex

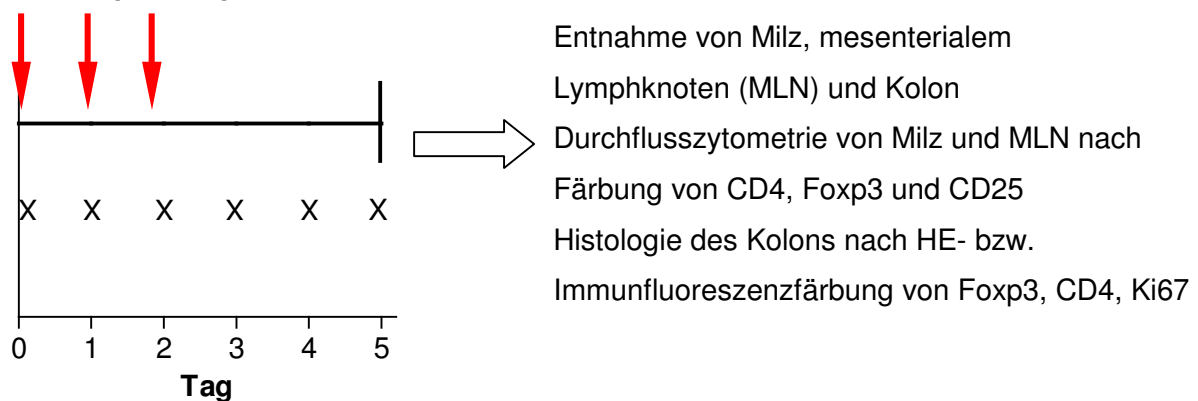


Abbildung 5 Design des IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex-Experiments

IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex wurde C57BL/6 Mäusen (n=10) am 0., 1. und 2. Tag des Experimentes appliziert (rote Pfeile). Als Kontrollgruppe dienten mit Isotyp-Kontrolle behandelte (n=10) bzw. unbehandelte Mäuse (n=5). Die Tiere wurden täglich gewogen (x). Das Experiment wurde an Tag 5 beendet. Zur Auswertung wurden Milz, mesenteriale Lymphknoten und Kolon entnommen. Milz und mesenteriale Lymphknoten wurden mittels Durchflusszytometrie nach Färbung von CD4, CD25 und Foxp3 untersucht. Kolonproben wurden histologisch nach HE-Färbung und Immunfluoreszenzfärbung von Foxp3, CD4 und des Proliferationsmarkers Ki67 untersucht und ausgewertet.

Es wurden keine Unterschiede im Gewichtsverlauf zwischen den einzelnen Versuchstiergruppen festgestellt (Abbildung 6). Alle Tiere wirkten gesund und zeigten typisches Verhalten. Demnach ist nicht von einer Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes durch Applikation von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex auszugehen.

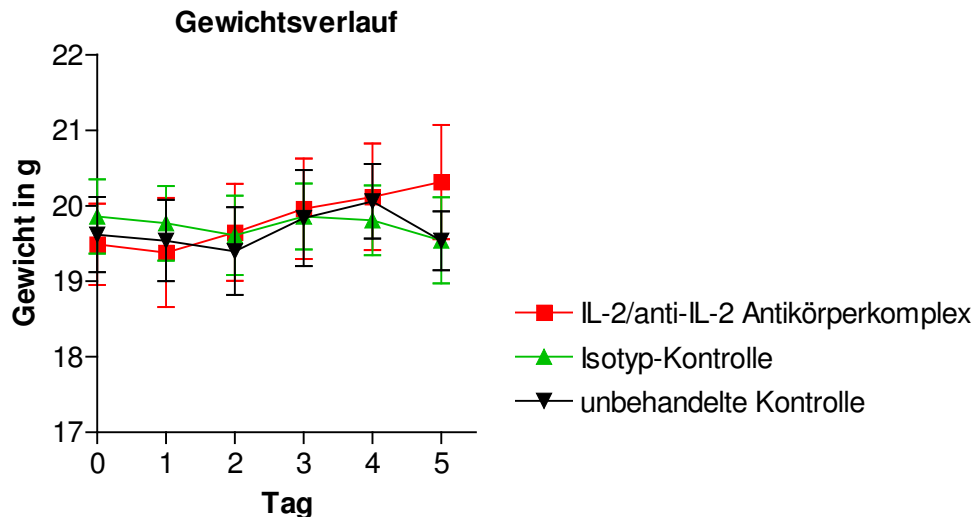


Abbildung 6 Eine Behandlung mit IL-2/anti-IL2-Antikörperkomplex führt nicht zur Gewichtsabnahme.

Gewichtsverlauf von mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Tieren (rot), mit Isotyp-Kontrolle behandelten Tieren (grün) und unbehandelten Tieren (schwarz). Die einzelnen Gruppen unterscheiden sich in ihrem Gewichtsverlauf nicht.

3.2. Mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelte Tiere zeigen Splenomegalie und Lymphadenomegalie

Bei Entnahme von mesenterialen Lymphknoten bzw. Milz zeigte sich bei behandelten Versuchstieren eine makroskopische Vergrößerung dieser Organe (Abbildung 7). Isotyp-Kontrollen unterschieden sich nicht von den unbehandelten Kontrollen (hier nicht gezeigt). Die Kolons aller Tiere unterschieden sich makroskopisch nicht. Sie erschienen äußerlich nicht entzündlich verändert und wiesen keine deutlichen Unterschiede in Länge, Färbung oder Dicke der Darmwand auf.

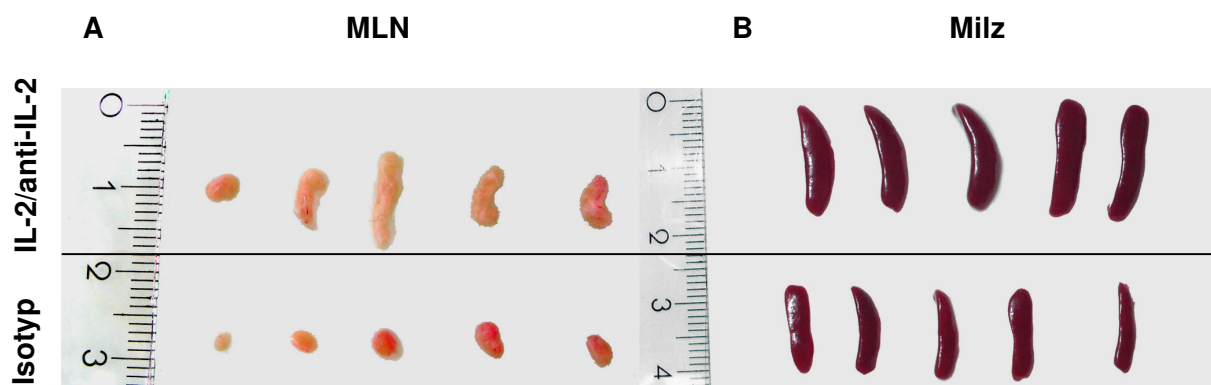


Abbildung 7 Mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelte Versuchstiere zeigen vergrößerte mesenteriale Lymphknoten und Splenomegalie.

A Mesenteriale Lymphknoten von mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Tieren (obere Reihe) erscheinen gegenüber mit Isotyp-Kontrollen behandelten Tieren (untere Reihe) deutlich vergrößert. **B** Milzen von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Tieren (obere Reihe) erscheinen gegenüber mit Isotyp-Kontrollen behandelten Tieren (untere Reihe) ebenfalls deutlich vergrößert.

3.3. Behandlung mit einem IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex führt zur präferentiellen Expansion regulatorischer T-Zellen in mesenterialen Lymphknoten und Milz

Die Menge regulatorischer T-Zellen von mesenterialen Lymphknoten und Milz wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Nach Färbung der Marker CD4, CD25 und Foxp3 konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex sowohl in Milz als auch im mesenterialen Lymphknoten zur präferentiellen Expansion von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen führt (Abbildung 8). Der Anteil CD4⁺ T-Zellen wird von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex hingegen nicht wesentlich gesteigert. Der relative Anteil CD4⁺ T-Zellen an den Zellen im Lymphozytengate der untersuchten mesenterialen Lymphknoten beträgt bei behandelten Tieren 40,3%±6,4%, bei Isotyp-Kontrollen 41,2%±3,8% und bei unbehandelten Kontrollen 40,3%±1,9%. Damit ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen für CD4⁺ T-Zellen im MLN. Der Anteil CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen an allen CD4⁺ T-Zellen ist demgegenüber bei Behandlung mit 23,8%±13,9% im mesenterialen Lymphknoten signifikant gegenüber den Kontrollgruppen (Isotyp-Kontrolle 5,4%±1,9%, $p < 0,0001$, unbehandelte Kontrolle 3,5%±1,8%, $p = 0,0007$) erhöht. Damit ist der Anteil regulatorischer T-Zellen in der Behandlungsgruppe mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex 4,5 (im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle) bzw. 6,8 mal (im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) höher als in den Kontrollgruppen.

Durch Applikation von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex wird der Anteil CD4⁺ T-Zellen der Milz an den Zellen im Lymphozytengate nicht gesteigert. Er beträgt bei behandelten Tieren 23,2%±1,6%, bei Isotyp-Kontrollen 18,7%±7,2% und bei unbehandelten Kontrollen 27,2%±3,3%. Damit ist der Anteil CD4⁺ T-Zellen in der Milz unbehandelter Kontrollen sogar signifikant höher als bei mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Tieren ($p = 0,005$). Der Anteil CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen ist in Milzen behandelter Tiere mit 33,4%±15,9% gegenüber 7,3%±3,1% (Isotyp-Kontrolle) und 2,9%±1,4% (unbehandelte Kontrolle) wiederum signifikant erhöht ($p < 0,0001$, gegenüber Isotyp-Kontrolle; $p = 0,0007$, gegenüber unbehandelte Kontrolle). Für regulatorische T-Zellen in Milzen behandelter Tiere wurde damit eine Steigerung des Anteils auf das 4,5-fache der Isotyp-Kontrolle und das 11,6-fache der unbehandelten Kontrollen ermittelt.

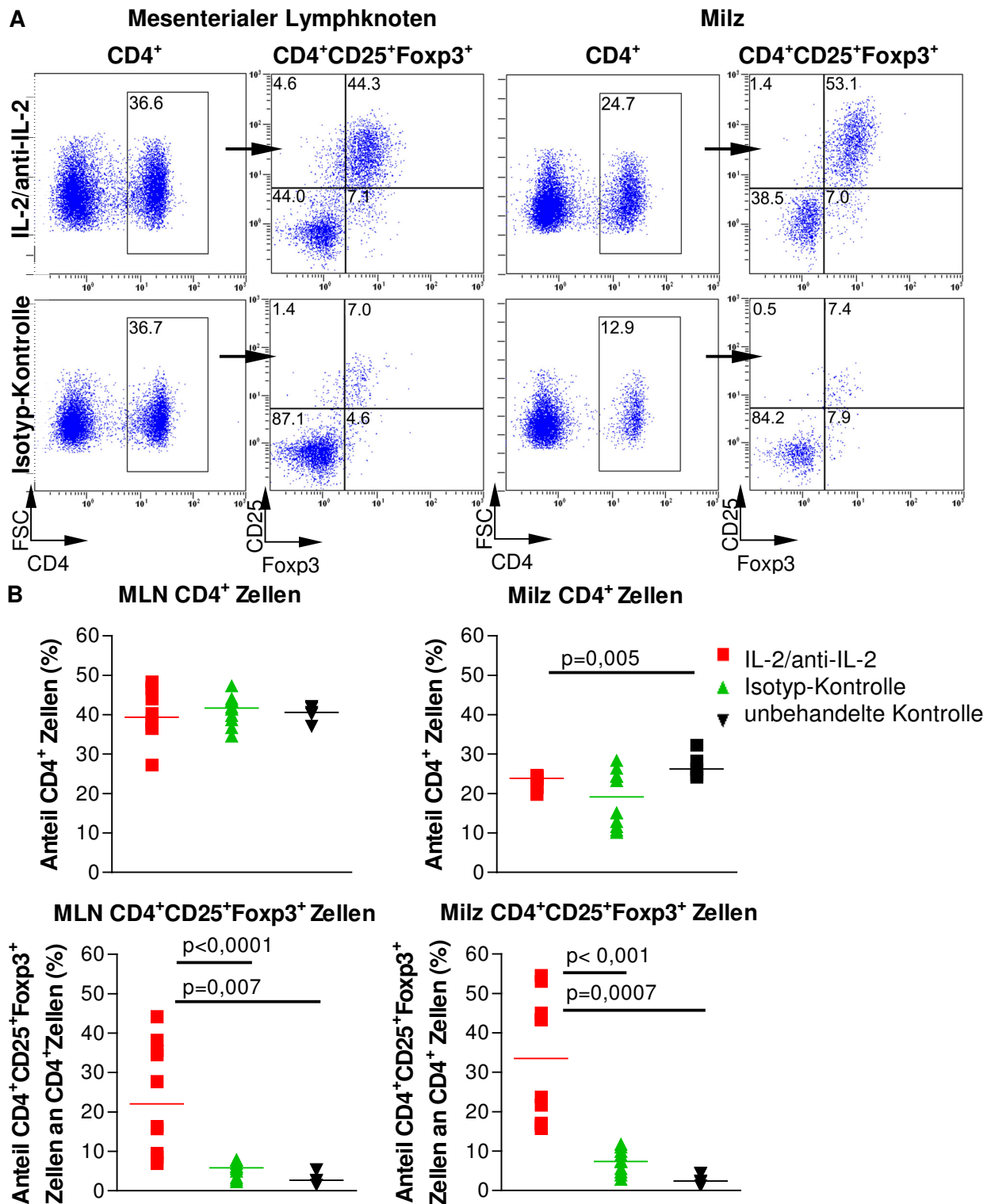


Abbildung 8 Behandlung mit einem IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex führt zur Expansion regulatorischer T-Zellen in mesenterialem Lymphknoten (MLN) und Milz.

A Durchflusszytometrie nach Färbung von CD4, CD25 und Foxp3 an MLN- bzw. Milzzellen von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Tieren (obere Reihe) und Isotyp-Kontrollen (untere Reihe). Die angegebenen Zahlen beziehen sich bei CD4⁺ T-Zellen auf den Anteil an gemessenen Zellen im Lymphozytengate, bei CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen auf den Anteil an CD4⁺ T-Zellen. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Tieres der jeweiligen Gruppe. **B** Kumulierte graphische Darstellung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie. Der Anteil CD4⁺ T-Zellen ist nach Behandlung weder im mesenterialen Lymphknoten noch in der Milz erhöht. Regulatorische T-Zellen werden in MLN und Milz präferentiell expandiert. IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex-Behandlung rot dargestellt, Isotyp-Kontrolle grün, unbehandelte Kontrolle schwarz.

3.4. Behandlung mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex führt nicht zu Kolitis

Es sollte evaluiert werden, ob eine Behandlung mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex zu einer Entzündung des Kolons führt. Histologische Zeichen für eine vermehrte Entzündungsaktivität z.B. durch von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex zur Proliferation angeregte Effektorzellen sollten beurteilt werden. Die Auswertung der Hämatoxylin/Eosin-gefärbten Kolonpräparate erfolgte verblindet mithilfe des in Kapitel 2.6.1 beschriebenen Kolitis-Scores. Beurteilte Kriterien waren eine Steigerung der Kryptenlänge, Epithelschäden, Lamina propria mucosae-Infiltrate, Abszessbildung, Becherzellverlust, Tunica muscularis-Ödem und Tela submucosa-Infiltrate. Der kleinstmögliche Score-Wert beträgt 0 Punkte. Der größtmögliche Score-Wert eines Kolons, bei dem alle sieben betrachteten Kriterien in vollem Maße ausgeprägt sind, beträgt 14 Punkte. Mit einem Kolitis-Score Wert von $2,1 \pm 0,7$ bei mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Tieren versus $1,9 \pm 0,8$ bei Isotyp-Kontrollen bzw. $2,0 \pm 0,9$ bei unbehandelten Kontrollen konnten keine signifikanten Unterschiede bei der histologischen Auswertung der Darmproben der Versuchstiere detektiert werden (Abbildung 9). Bei keiner der Proben wurde mit einem Kolitis-Score-Wert >4 eine relevante Entzündung festgestellt. Aus dem histologischen Bild können nur bedingt Aussagen über die Ätiologie der Schädigung der Kolonarchitektur abgeleitet werden. Ursache für erhöhte Werte des Kolitis-Scores könnten auch präparationsbedingte mechanische Schäden sein, die einen Einfluss auf die Kriterien Epithelschäden und Tunica muscularis Ödem haben würden. Ein vermehrtes Infiltrat der Lamina propria mucosae bei mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Tieren wurde in der HE Färbung nicht bemerkt.

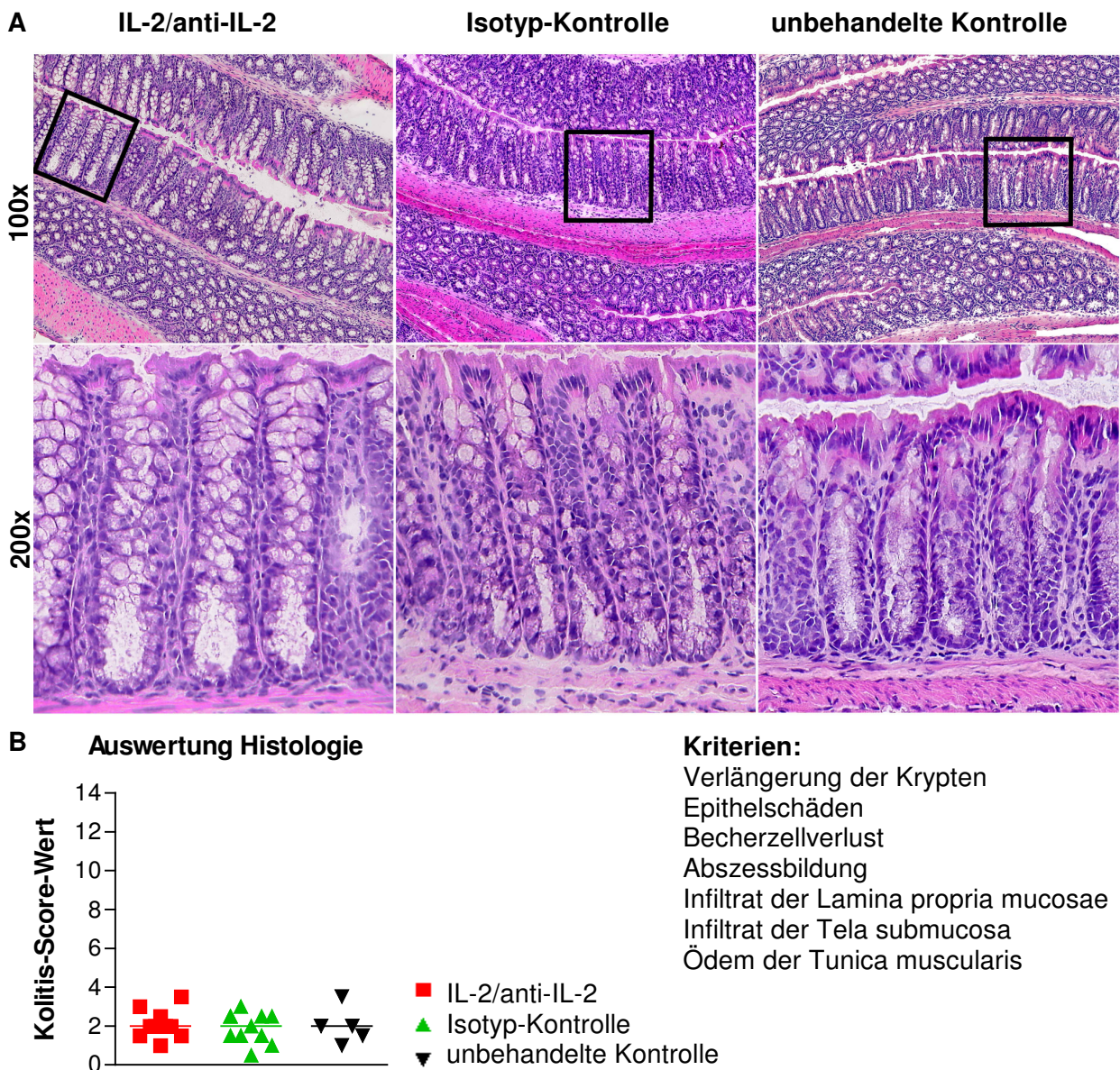


Abbildung 9 Eine Behandlung mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex führt histologisch nicht zu einer Kolitis.

A Obere Reihe: 100-fache Vergrößerung von Kolonschnitten einer mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Maus (links), einer mit Isotyp-Kontrolle behandelten (Mitte) und einer unbehandelten Maus (rechts). In der unteren Reihe sind die oben markierten Areale vergrößert dargestellt. Hier betrug die Original-Vergrößerung 200x. **B** Die Gewebeschnitte wurden mittels des Kolitis-Scores beurteilt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Kolitis-Score-Werte von Tieren, die mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelt wurden, sind rot dargestellt, Isotyp-Kontrollen grün, unbehandelte Kontrollen schwarz.

3.5. Behandlung mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex führt zur präferentiellen Expansion regulatorischer T-Zellen in der Lamina propria mucosae

Um festzustellen, ob eine Behandlung mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex auch peripher im Kolongewebe Einfluss auf die Zahl Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen und ihr zahlenmäßiges Verhältnis zu CD4⁺ T-Zellen hat, wurden Immunfluoreszenzfärbungen von CD4 (Abbildung 10 A, rot dargestellt) und Foxp3 (Abbildung 10 A, grün dargestellt) durchgeführt. Es wurden mikroskopische Aufnahmen der Lamina propria mucosae in 200-facher Vergrößerung gemacht. Ausgeschlossen werden sollte, dass es durch die Auswertung verschieden großer Gewebeareale pro Bildausschnitt lediglich zu einer scheinbaren Steigerung der Zahl CD4⁺Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen durch IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex kommt. Deshalb wurde die Fläche der ausgewerteten Lamina propria mucosae Areale vermessen und die ermittelte Zahl CD4⁺ T-Zellen und CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen auf mm² normiert (Abbildung 10). Bei der Auswertung zeigte sich für Lamina propria mucosae, dass die Zahl CD4⁺ T-Zellen mit 285,6±42,3 CD4⁺ T-Zellen/mm² bei behandelten Versuchstieren versus 215,3±89,8 CD4⁺ T-Zellen/mm² (Isotyp-Kontrolle) bzw. 195,3±87,2 CD4⁺ T-Zellen/mm² (unbehandelte Kontrolle) moderat auf etwa das 1,3-fache der Kontrollen erhöht ist. Damit ergibt sich gegenüber der Isotyp-Kontrolle (p=0,009), nicht jedoch gegenüber unbehandelten Kontrolltieren (p=0,1) eine signifikante Steigerung der Zahl CD4⁺ T-Zellen. Die Zahl CD4⁺Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen ist bei Behandlung mit 64,6±33,1 regulatorischen T-Zellen/mm² versus 16,3±4,4 regulatorischen T-Zellen/mm² (Isotyp-Kontrolle) bzw. 27,2±12,0 regulatorischen T-Zellen/mm² (unbehandelte Kontrolle) auf das 4- bzw. 2-fache erhöht. Die Steigerung der Zahl regulatorischer T-Zellen/mm² der Lamina propria mucosae behandelter Versuchstiere ist signifikant (p<0,0001 gegenüber Isotyp-Kontrollen; p=0,003 gegenüber unbehandelten Kontrollen). Der Anteil von CD4⁺Foxp3⁺Zellen an allen CD4⁺ Zellen war bei mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Versuchstieren gegenüber den Kontrollen auf das 2- bis 3-fache erhöht (0,3±0,2 nach Behandlung mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex versus 0,09±0,04 bei Isotyp-Kontrollen, p=0,0002 bzw. 0,1±0,3 bei unbehandelten Kontrollen, p=0,028).

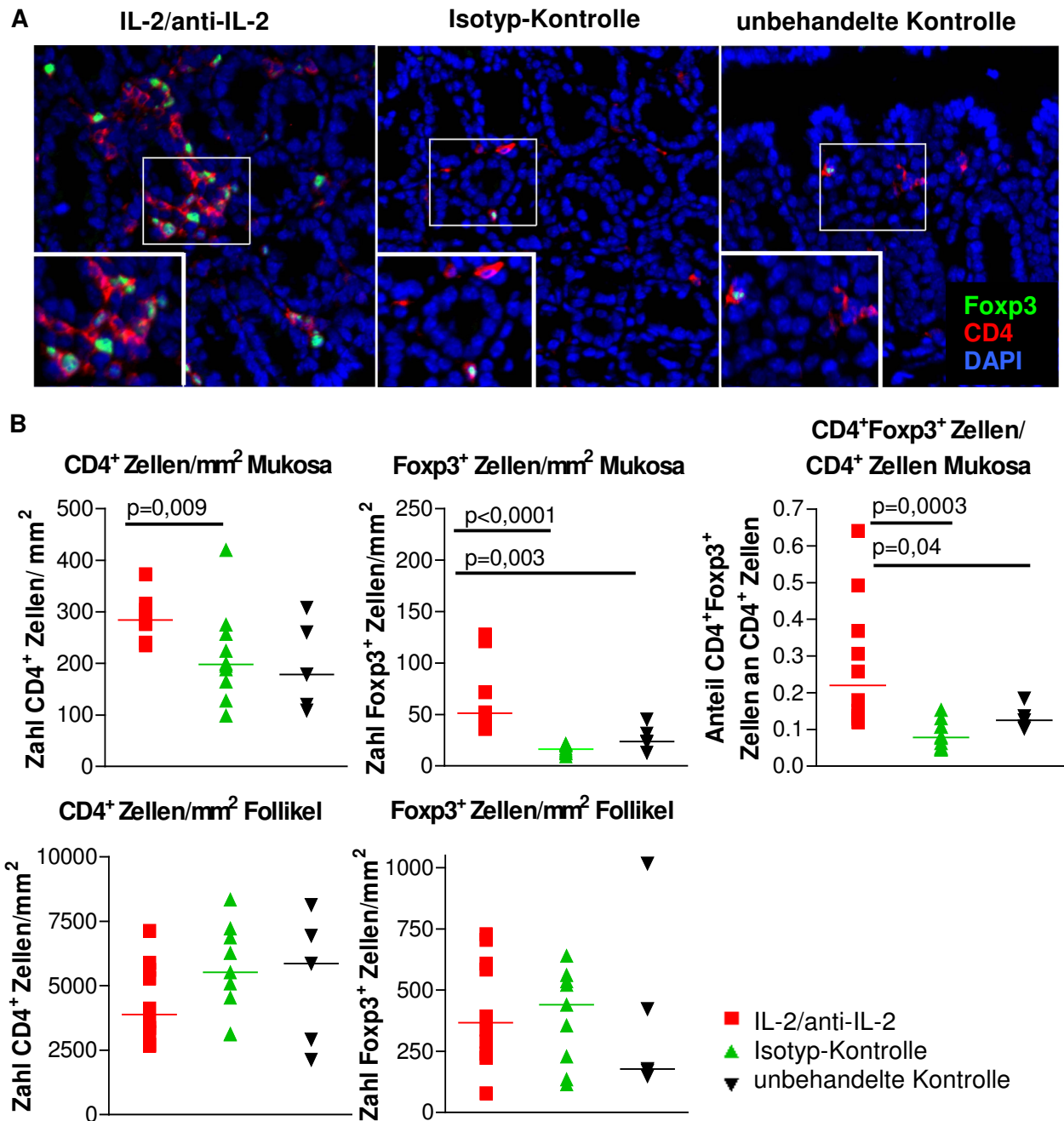


Abbildung 10 Behandlung mit IL-2/anti-IL2-Antikörperkomplex führt zur präferentiellen Expansion regulatorischer T-Zellen in der Lamina propria mucosae, nicht jedoch im Follikel.

A Dargestellt sind Immunfluoreszenzfärbungen von Kolonproben einer mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Maus (links), einer mit Isotyp-Kontrolle behandelten Maus (Mitte) und einer unbehandelten Maus (rechts), Foxp3 (grün), CD4 (rot) und DAPI (blau). Es zeigt sich eine deutliche Steigerung CD4⁺Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen bei mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Versuchstieren gegenüber den Kontrollen. Die dick gerahmten Bilder stellen jeweils Vergrößerungen der dünn gerahmten Bildausschnitte dar. Die Originalvergrößerung betrug 200-fach.

B Graphische Darstellung der Auswertungsergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung aus A normalisiert auf die Fläche von Tunica mucosa bzw. lymphoidem Follikel in mm². Die Zahl CD4⁺ T-Zellen/mm² steigt bei lymphoiden Follikeln IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelte Tiere nicht, in der Lamina propria mucosae signifikant an. Die Zahl CD4⁺Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen/mm² ist in der Lamina propria mucosae IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelte Tiere deutlich und signifikant erhöht, nicht jedoch in lymphoiden Follikeln. Werte mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelte Tiere rot dargestellt, mit Isotyp-Kontrolle behandelte Tiere grün, die unbehandelte Kontrollen schwarz.

Es sollte ermittelt werden, ob die Zahl regulatorischer T-Zellen ausschließlich in der Lamina propria mucosae von mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Tieren gesteigert ist, oder ob dies auch für lymphoide Follikel gilt. Deshalb wurden $CD4^+$ T-Zellen sowie $CD4^+Foxp3^+$ regulatorische T-Zellen in lymphoiden Follikeln gezählt und auf mm^2 normiert. Die Zahl $CD4^+$ T-Zellen/ mm^2 in lymphoiden Follikeln beträgt bei mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Versuchstieren durchschnittlich $4376,0 \pm 1526,9$. Das entspricht etwa dem Wert bei mit Isotyp-Kontrolle behandelten ($5572,4 \pm 1798,9$ $CD4^+$ T-Zellen/ mm^2) bzw. unbehandelten Kontrolltieren ($5200,3 \pm 2588,2$ $CD4^+$ T-Zellen/ mm^2). Die Zahl $CD4^+Foxp3^+$ regulatorischer T-Zellen/ mm^2 in lymphoiden Follikeln von mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Tieren unterscheidet sich mit $420,1 \pm 223,8$ $CD4^+Foxp3^+$ regulatorischen T-Zellen/ mm^2 ebenfalls nicht wesentlich von der ermittelten Zahl bei Isotyp-Kontrollen ($392,4 \pm 193,7$ $CD4^+Foxp3^+$ regulatorische T-Zellen/ mm^2) oder unbehandelten Kontrollen ($387,4 \pm 369,1$ $CD4^+Foxp3^+$ regulatorische T-Zellen/ mm^2). Der Anteil $CD4^+Foxp3^+$ regulatorischer T-Zellen an den in lymphoiden Follikeln gezählten $CD4^+$ T-Zellen war mit $0,1 \pm 0,05$ bei IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex-behandelten Tieren gegenüber $0,08 \pm 0,04$ bei mit Isotyp-Kontrolle behandelten bzw. $0,07 \pm 0,04$ bei unbehandelten Kontrollen nicht signifikant erhöht. Die Steigerung der Zahl regulatorischer T-Zellen im Kolon beschränkt sich somit auf die Lamina propria mucosae von mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Tieren und kann in lymphoiden Follikeln nicht nachgewiesen werden. Dabei können keine Aussagen darüber gemacht werden, ob regulatorische T-Zellen durch IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex in der Lamina propria mucosae zur Proliferation angeregt werden, ob sie aus lymphoiden Follikeln einwandern oder aber über das Blut dorthin gelangen. Es zeigt sich in der Immunfluoreszenzmikroskopie, dass in der Lamina propria mucosae behandelte Tiere präferentiell regulatorische T-Zellen expandiert werden. Die Anregung anderer $CD4^+$ T-Zellen zur Expansion fällt gering aus.

3.6. IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex steigert die Proliferation regulatorischer T-Zellen in der Lamina propria mucosae und lymphoiden Follikeln des Kolons

Es sollte ermittelt werden, ob die Steigerung der Zahl regulatorischer T-Zellen in der Lamina propria mucosae von mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Versuchstieren eher durch lokale Proliferation oder durch Einwanderung von zentral in das Gewebe begründet ist. Dies geschah nach Immunfluoreszenzfärbung von Foxp3 (Abbildung 11 A, rot dargestellt) und dem Proliferationsmarker Ki67 (Abbildung 11 A, grün dargestellt). Ki67 wird von allen proliferierenden Zellen exprimiert, unabhängig, ob es sich etwa um T-Zellen oder um Kryptenepithelzellen handelt. In Teilung befindliche regulatorische T-Zellen stellen sich durch die Überlagerung der Signale von Foxp3 und Ki67 orange dar (Abbildung 11 A, in eingebetteten Bildern durch Pfeile gekennzeichnet). Die Zahl $Foxp3^+Ki67^+$ regulatorischer T-

Zellen in lymphoiden Follikeln wurde durch die Bildanalysesoftware CellProfiler ermittelt (s.a. 2.6.3.). Die Normalisierung auf mm^2 erfolgte nach manueller Messung der Fläche der lymphoiden Follikel bzw. der Tunica mucosa. Die Ermittlung der Zahl proliferierender regulatorischer T-Zellen in der Lamina propria mucosae erfolgte durch manuelle Zählung.

In lymphoiden Follikeln von behandelten Tieren wurden $51,1 \pm 53,0$ $\text{Ki67}^+\text{Foxp3}^+$ proliferierende regulatorische T-Zellen/ mm^2 gezählt. Dies ist gegenüber $12,4 \pm 9,3$ $\text{Ki67}^+\text{Foxp3}^+$ regulatorischen T-Zellen/ mm^2 bei mit Isotyp-Kontrolle behandelten Tieren bzw. $15,9 \pm 9,6$ $\text{Ki67}^+\text{Foxp3}^+$ regulatorischen T-Zellen/ mm^2 bei unbehandelten Kontrollen eine Steigerung auf etwa das 4-fache. Die Steigerung ist signifikant mit $p=0,0015$ gegenüber Isotyp-Kontrollen bzw. $p=0,04$ gegenüber unbehandelten Kontrollen (Abbildung 11 B, obere Reihe). Der Anteil proliferierender regulatorischer T-Zellen an allen gezählten regulatorischen T-Zellen ist in lymphoiden Follikeln von mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Tieren auf das Doppelte der untersuchten Kontrollen gesteigert ($0,10 \pm 0,04$ IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex-Behandlung versus $0,04 \pm 0,03$ bei Behandlung mit Isotyp-Kontrolle bzw. $0,05 \pm 0,01$ bei unbehandelten Kontrollen). Die Steigerung ist mit $p=0,004$ gegenüber mit Isotyp-Kontrolle behandelten Tieren bzw. $p=0,013$ gegenüber unbehandelten Kontrolltieren signifikant.

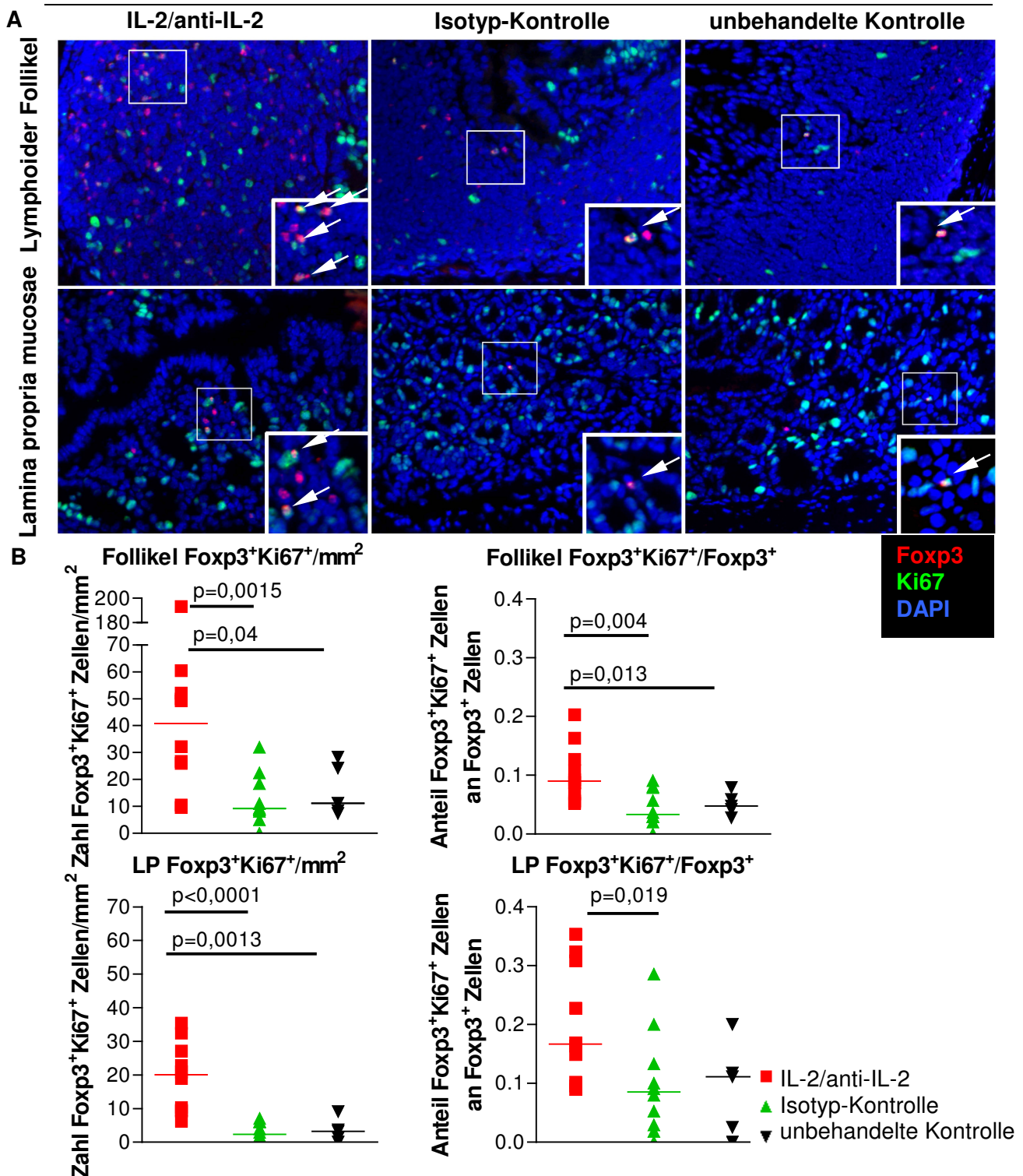


Abbildung 11 Die Zahl $\text{Foxp3}^+\text{Ki67}^+$ T-Zellen ist in lymphoiden Follikeln und in der Lamina propria mucosae IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelte Tiere erhöht.

A Immunfluoreszenzfärbung lymphoider Follikel (obere Reihe) und Lamina propria mucosae (LP, untere Reihe) von mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Tieren (links), Isotyp-Kontrollen (Mitte) und unbehandelten Kontrollen (rechts). Ki67^+ proliferierende Zellen sind grün dargestellt, Foxp3^+ regulatorische T-Zellen rot, $\text{Foxp3}^+\text{Ki67}^+$ orange (mit Pfeilen gekennzeichnet). Die Vergrößerung der dünn gekennzeichneten Ausschnitte sind jeweils dick gerahmt. Die Originalvergrößerung betrug 200-fach. **B** Die Zahl $\text{Foxp3}^+\text{Ki67}^+$ T-Zellen/ mm^2 ist sowohl im lymphoiden Follikel als auch in der Lamina propria mucosae bei IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Tieren signifikant gesteigert. Der Anteil $\text{Foxp3}^+\text{Ki67}^+$ T-Zellen ist bei IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Tieren doppelt so hoch wie in den Vergleichsgruppen. Werte IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelte Tiere sind rot dargestellt, Isotyp-Kontrollen grün, unbehandelte Kontrollen schwarz.

Auch in der Lamina propria mucosae zeigt sich eine Steigerung der Zahl proliferierender regulatorischer T-Zellen gegenüber den Kontrollgruppen. Es wurden bei behandelten Tieren $19,4 \pm 10,3$ proliferierende regulatorische T-Zellen/mm² ausgewertete Bildfläche gezählt. Bei Isotyp-Kontrollen proliferierten durchschnittlich $3,2 \pm 2,5$ regulatorische T-Zellen/mm² gegenüber $3,5 \pm 3,5$ Foxp3⁺Ki67⁺ regulatorischen T-Zellen/mm² bei unbehandelten Kontrollen. Es ergibt sich damit durch IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex eine Steigerung der Zahl proliferierender regulatorischer T-Zellen/mm² auf etwa das 5-fache. Diese Steigerung ist mit $p < 0,0001$ gegenüber der Isotyp-Kontrolle bzw. $p = 0,0013$ gegenüber unbehandelten Kontrollen signifikant (Abbildung 11 B, untere Reihe). Der Anteil proliferierender regulatorischer T-Zellen an allen gezählten regulatorischen T-Zellen ist mit $0,20 \pm 0,09$ versus $0,10 \pm 0,09$ bei mit Isotyp-Kontrolle behandelten Tieren und $0,09 \pm 0,08$ bei unbehandelten Tieren bei mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Tieren auf das Doppelte gesteigert. Der Unterschied ist gegenüber Isotyp-Kontrollen signifikant ($p = 0,019$). Gegenüber unbehandelten Kontrollen konnte in diesem Punkt keine Signifikanz erreicht werden ($p = 0,129$).

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Zahl proliferierender regulatorischer T-Zellen als auch die Proliferationsrate regulatorischer T-Zellen durch IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex sowohl im lymphoiden Follikel als auch in der Lamina propria mucosae gegenüber mit Isotyp-Kontrolle behandelten Tieren gesteigert wird. Gegenüber unbehandelten Kontrollen konnte durch IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex eine signifikante Steigerung der Zahl proliferierender T-Zellen in lymphoiden Follikeln und in der Lamina propria mucosae erreicht werden. Die Steigerung des Anteils proliferierender regulatorischer T-Zellen an den gezählten regulatorischen T-Zellen wurde gegenüber unbehandelten Kontrolltieren für lymphoide Follikel, nicht jedoch für Lamina propria mucosae als signifikant angesehen. Die gesteigerte Zahl regulatorischer T-Zellen in der Lamina propria mucosae von mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Tieren lässt sich somit durch eine erhöhte Proliferation vor Ort begründen. Eine Einwanderung aus lymphoiden Follikeln ist aufgrund der erhöhten Proliferationsrate bei gleicher Zahl regulatorischer T-Zellen in diesem Gewebe wahrscheinlich. Eine Immigration regulatorischer T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten oder dem Thymus in die Lamina propria mucosa nach Behandlung mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex ist möglich.

3.7. Regulatorische T-Zellen sind nach Behandlung mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex weiter mit proliferierenden Zellen assoziiert.

Bei Vorexperimenten und Experimenten von Dr. Andrea Brockel (Universitätsklinikum Leipzig) und Dr. Norman Händel war aufgefallen, dass Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen öfter in Assoziation mit Ki67⁺ proliferierenden Zellen vorliegen als dies aufgrund der zufälligen

Verteilung beider Zelltypen im Gewebe erklärbar ist¹¹⁷. Diese Assoziation sollte auch nach Behandlung mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex untersucht werden. An Kolongewebeproben von mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Versuchstieren sowie von Isotyp-Kontrollen und unbehandelten Kontrollen wurden die Marker Foxp3 für regulatorische T-Zellen (Abbildung 12 A, rot dargestellt) und Ki67 für proliferierende Zellen (Abbildung 12 A, grün dargestellt) mittels Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Mit der Software CellProfiler wurden Bilddateien lymphoider Follikel ausgewertet. Es wurde ermittelt, dass bei mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Tieren ein Anteil von $0,29 \pm 0,02$ der regulatorischen T-Zellen in Kontakt mit proliferierenden T-Zellen stehen. Bei Isotyp-Kontrollen war das bei einem Anteil $0,21 \pm 0,02$ der Fall. Bei unbehandelten Kontrollen war ein Anteil von $0,27 \pm 0,03$ der regulatorischen T-Zellen mit proliferierenden T-Zellen in Kontakt. Aus dem Anteil Ki67⁺ T-Zellen an allen ausgewerteten Zellen und der Zelldichte im Gewebe lässt sich mithilfe eines statistischen Modells (s. 0) ein Erwartungswert für die Zahl regulatorischer T-Zellen in Kontakt mit proliferierenden T-Zellen berechnen. Es ergab sich bei mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Tieren ein Erwartungswert von 0,16; für mit Isotyp-Kontrolle behandelte Tiere von 0,12 und für unbehandelte Tiere von 0,14. Damit übersteigt der tatsächliche Anteil regulatorischer T-Zellen in Kontakt mit proliferierenden T-Zellen in allen untersuchten Gruppen den Erwartungswert. Dies gilt auch dann, wenn die Überschätzung des Anteils regulatorischer T-Zellen in Kontakt mit proliferierenden T-Zellen von 15% (s. 2.6.3) durch CellProfiler in Betracht gezogen wird.

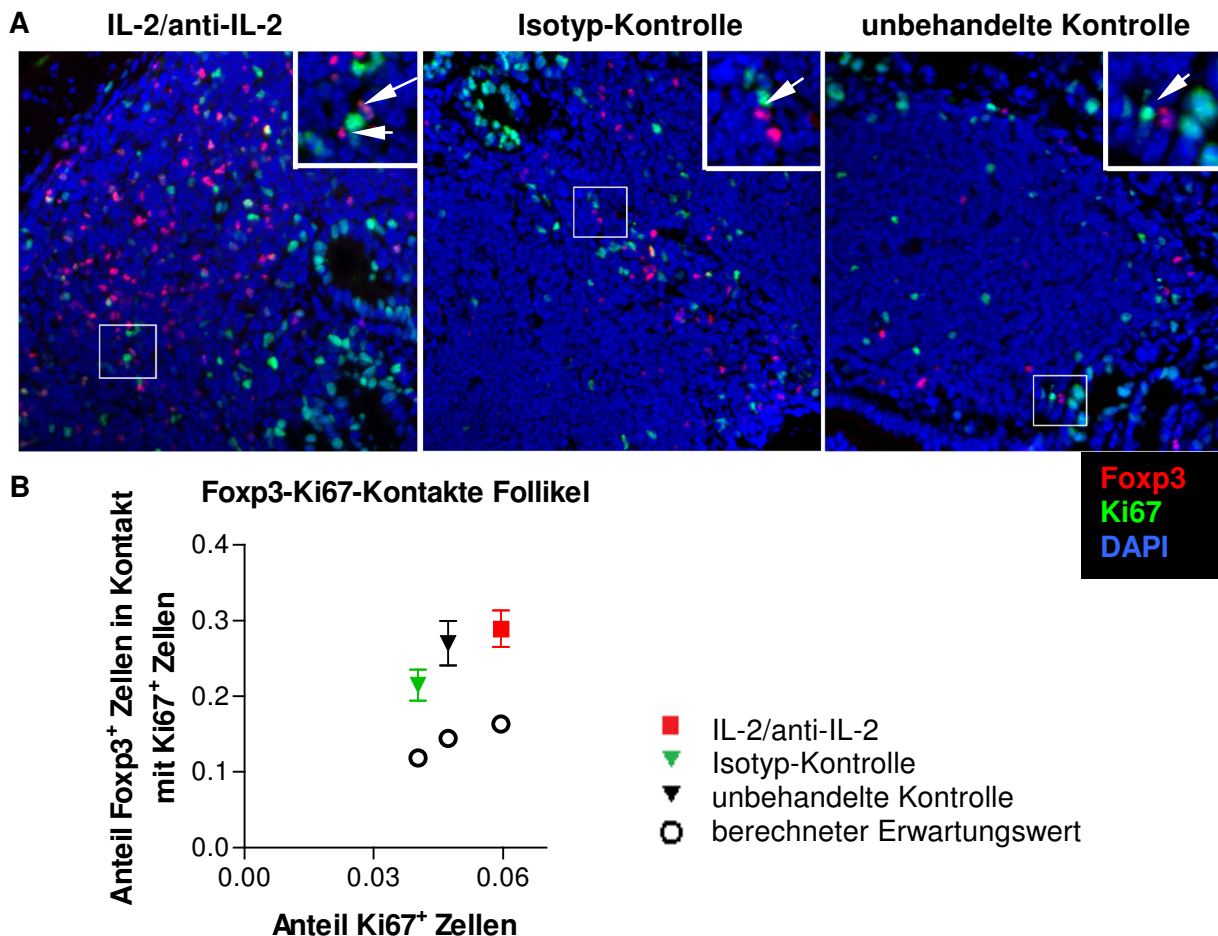


Abbildung 12 Fxp3⁺ regulatorische T-Zellen sind mit Ki67⁺ proliferierenden Zellen assoziiert.

A Immunfluoreszenzfärbung Fxp3⁺ regulatorischer T-Zellen (rot) und Ki67⁺ proliferierender Zellen (grün). Das linke Bild zeigt den lymphoiden Follikel des Kolons einer mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Maus, mittig lymphoider Follikel nach Behandlung mit Isotyp-Kontrolle, rechts lymphoider Follikel einer unbehandelten Kontroll-Maus. Mit dünnen Linien gekennzeichnete Ausschnitte sind vergrößert und dick gerahmt in der rechten oberen Ecke des jeweiligen Bildes dargestellt. Die Pfeile kennzeichnen Kontakte zwischen regulatorischen T-Zellen und proliferierenden Zellen. Die Originalvergrößerung betrug 200-fach. **B** Graphische Darstellung der Auswertung oben gezeigter Immunfluoreszenzfärbungen. Die ermittelte Zahl der Kontakte in lymphoiden Follikeln von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Tieren (rot), Isotyp-Kontrollen (grün) und unbehandelten Kontrollen (schwarz) übersteigt deutlich den berechneten Erwartungswert (offener schwarzer Kreis). Die Zahl der Kontakte zwischen regulatorischen T-Zellen und proliferierenden Zellen kann damit bei keiner der untersuchten Behandlungsgruppen durch zufällige Verteilung beider Zellarten im Gewebe erklärt werden.

3.8. MALDI-Imaging als Möglichkeit der Proteinexpressionsanalyse in situ

Die Akkumulation von Fxp3⁺ regulatorischen T-Zellen an proliferierenden Zellen in unbehandelten wildtyp Mäusen ist zytokinabhängig. Bei IL-2 defizienten Versuchstieren ist die überzufällig häufige Assoziation dieser Zellen nicht mehr nachweisbar¹¹³. Bei der Untersuchung lymphoider Follikel des Kolons gesunder wildtyp Mäuse war die mRNA-Expression von IL-2 gegenüber anderen Kompartimenten erhöht¹¹³. Die IL-2-mRNA-Expression von Ki67⁺ Einzelzellen konnte jedoch nicht eindeutig bestimmt werden. Die erhöhte Kontaktrate regulatorischer T-Zellen und proliferierender Zellen in lymphoiden

Follikeln des Kolons kann u.a. als Zeichen der lokalen Versorgung regulatorischer T-Zellen mit IL-2 durch proliferierende Ki67⁺ T-Zellen gedeutet werden. Um diese These weiter zu untersuchen, sollte gezeigt werden, dass Ki67⁺ proliferierende Zellen relevante Mengen an IL-2 exprimieren. Die Proteinexpressionsanalyse mittels MALDI-Imaging erschien dafür zweckmäßig. Sie ermöglicht die Expressionsanalyse intakter Gewebe und die Zuordnung der detektierten Proteine zu bestimmten Regionen. Ziel war die Expressionsanalyse Ki67⁺ proliferierender Einzelzellen mit Nachweis von IL-2. Aufgrund der Wahl von Sinapinsäure als Matrix und der Probenpräparation mit Ethanol, bei der kleinere Moleküle wie z.B. Fette aus dem Präparat herausgewaschen werden, wird davon ausgegangen, dass die detektierten Biomoleküle Peptide und Proteine darstellen.

Abbildung 13 gibt einen Überblick über die Vorgehensweise bei der Analyse der Proteinexpressionsmuster bei ungefärbten Proben und nach Markierung Ki67⁺ Zellen mit Streptavidin bzw. DAB. Zunächst wurde die Methode an vollständigen Gewebeschnitten von Ileum, Zäkum, Thymus und mesenterialem Lymphknoten (MLN) evaluiert. Zäkum und Ileum wurden in die lichtmikroskopisch unterscheidbaren Regionen lymphoider Follikel, Tunica mucosa und Bindegewebe unterteilt. Es wurden in beiden Darmabschnitten Peptide und Proteine ermittelt, die präferentiell in einer der drei Regionen exprimiert werden. Die Expression in den drei untersuchten Regionen wurde zwischen Ileum und Zäkum verglichen. So sollten präparationsbedingte Fehler minimiert werden. Die als präferentiell in lymphoiden Follikeln von Zäkum und Ileum exprimiert ermittelten Molekülmassen wurden mit signifikanten Massen aus Thymus und mesenterialen Lymphknoten verglichen. So wurden Peptide und Proteine ermittelt, die in allen untersuchten lymphoiden Geweben präferentiell exprimiert werden. Um Ki67⁺ Zellen zu kennzeichnen, wurde an Ileum und Zäkum eine Antikörperfärbung mit unmarkiertem Streptavidin durchgeführt. Dieses sollte als Masse-Tag an Ki67⁺ proliferierenden Zellen dienen. Alternativ wurden Ki67⁺ proliferierende Zellen des mesenterialen Lymphknotens immunhistochemisch mit dem Chromogen DAB gefärbt und daraufhin mittels MALDI-Imaging analysiert (Abbildung 13 E, Abbildung 18). Bei allen Proben wurden Massen zwischen 2000 und 20000 Dalton (Da) detektiert. Dabei wurden zwischen 1500 und 7800 Einzelspektren von Messpunkten mit einem Durchmesser von jeweils 30µm bestimmt. Der Abstand der einzelnen Messpunkte voneinander betrug ca. 10µm. Einzelspektren wurden aus den Ergebnissen von jeweils 200 Laserbestrahlungen desselben Messpunktes aufsummiert. Bei der Einzelzellanalyse betrug der Durchmesser der Messpunkte 10µm.

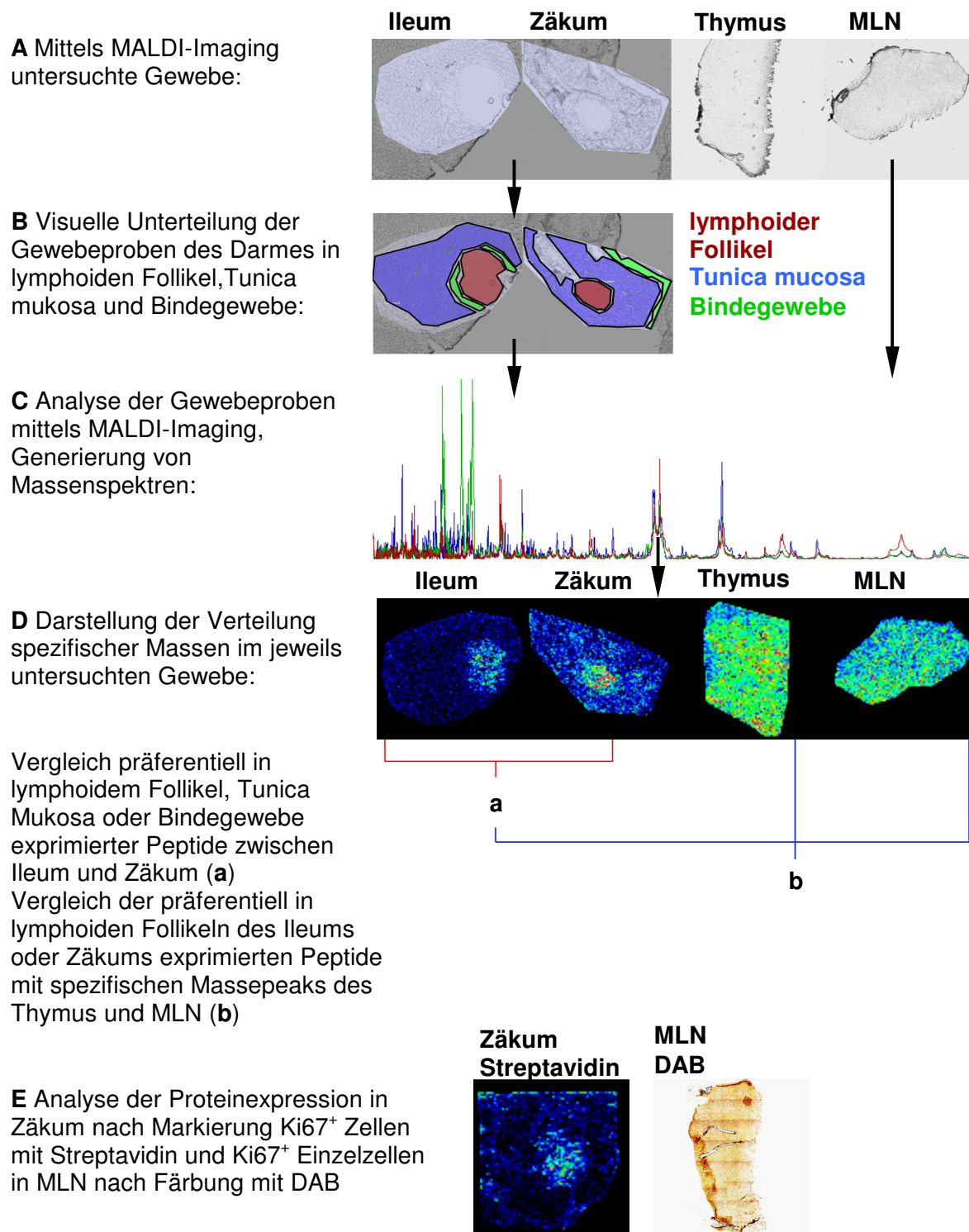


Abbildung 13 Vorgehensweise der Analyse der Proteinexpression von Ileum, Zäkum, Thymus und mesenterialem Lymphknoten (MLN) sowie Ki67⁺ Einzelzellen mittels MALDI-Imaging

A Die Proteinexpression von Ileum, Zäkum, Thymus und mesenterialem Lymphknoten (MLN) wurden mittels MALDI-Imaging untersucht. **B** In den Darmabschnitten wurden visuell lymphoide Follikel, Tunica mukosa und Bindegewebe voneinander abgegrenzt. **C** Die Gewebe wurden mittels MALDI-Imaging analysiert. Spezifische Massen wurden ermittelt. **D** Die Verteilung der Massen im Gewebe wurde dargestellt. Die für die verschiedenen Gewebe von Ileum und Zäkum ermittelten Massen wurden verglichen. Massen, die als präferentiell in lymphoiden Follikeln exprimiert identifiziert wurden, wurden mit spezifischen Massepeaks aus MLN und Thymus verglichen. **E** Diese Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen nach Markierung Ki67⁺ Zellen mit Streptavidin und nach Einzelzellanalyse Ki67⁺ Zellen nach Färbung mit DAB verglichen. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Mario Heindl und Dr. Michael Becker, Bruker Daltonik GmbH, Bremen durchgeführt.

Mithilfe des Auswertungsprogramms ClinProTools 2.2 wurden relevante Massepeaks ermittelt. Bei den Messungen mittels MALDI-Imaging werden Daten mit relativen Einheiten (arbitrary unit, au) generiert. Um Daten aus den drei unterschiedenen Regionen einer Gewebeprobe oder von verschiedenen Gewebeproben miteinander vergleichen zu können, wurde ein Quotient aus Signal und Hintergrundrauschen gebildet¹¹⁸. Als relevant wurde ein Signal angesehen, welches das Hintergrundrauschen um das ≥ 5 -fache überstieg. Als präferentiell in einer der Regionen lymphoider Follikel, Tunica mucosa oder Bindegewebe exprimiert galten Biomoleküle dann, wenn sie im Vergleich zu den beiden anderen untersuchten Regionen in 2-facher Intensität detektiert wurden. Relevante Proteinmassen wurden mithilfe des frei zugänglichen Proteindatenbank-Suchinstruments MS-Fit (Baker, P.R. und Clauser, K.R.; <http://prospector.ucsf.edu>) mit der Datenbank SwisProt.2010.03.30 sowie der Protein knowledge base UniProtKB (<http://www.uniprot.org>) abgeglichen.

3.8.1. Vergleich der Proteinexpression in verschiedenen Geweben von Ileum und Zäkum mit der Expression in Thymus und mesenterialem Lymphknoten

Die Ileumgewebeprobe wurde lichtmikroskopisch in die Regionen lymphoider Follikel, Tunica mucosa und Bindegewebe eingeteilt (Abbildung 14 A und B). Diese wurden auf ihre Proteinexpression untersucht. Insgesamt wurden Datensätze von 7474 Messpunkten mit einem Durchmesser von jeweils 30µm generiert, 1155 waren dem lymphoiden Follikel, 4170 der Tunica mucosa und 348 Bindegewebe zugeordnet. Der Fehlbetrag hatte lichtmikroskopisch keiner der drei Regionen sicher zugeordnet werden können. Es konnten 12 Massen identifiziert werden, die präferentiell in lymphoidem Follikel exprimiert werden. 15 Massen wurden bevorzugt in der Tunica mucosa detektiert. 7 Moleküle konnten dem Bindegewebe zugeordnet werden (s. Abbildung 14 C, D und Tabelle 2). Die Größe der Proteine und Peptide, die präferentiell in lymphoidem Follikel oder Tunica mucosa detektiert wurden, war über das gesamte untersuchte Massenspektrum verteilt. Peptide aus dem Bindegewebe waren hingegen ausschließlich in einem Massebereich unter 5000Da zu finden.

In Abbildung 14 C ist das gemittelte Spektrum der jeweils untersuchten Region abgebildet. Abbildung 14 D zeigt in einer 2-dimensionalen Darstellung das Spektrum jedes einzelnen Messpunktes. Dabei entspricht jeweils eine Zeile einem Messpunkt von 30µm Durchmesser. Die Intensität einer „Bande“ entspricht der Häufigkeit der Detektion von Peptiden und Proteinen der jeweiligen Molekülgröße. Der Abbildung kann entnommen werden, dass sich die einzelnen Regionen weniger durch die Art der detektierten Proteine unterscheiden, sondern eher durch die Intensität ihrer Detektion.

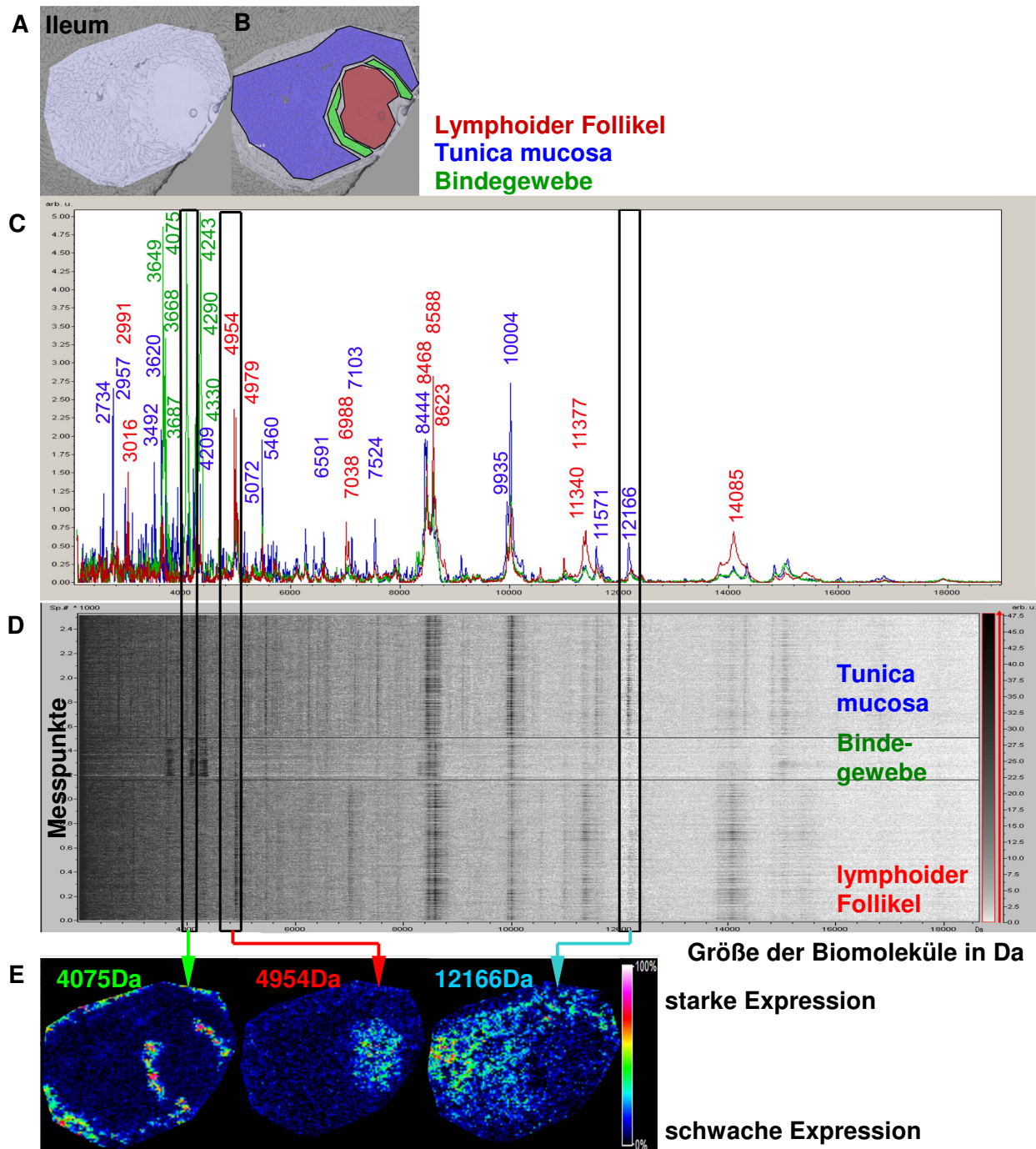


Abbildung 14 MALDI-Imaging einer ungefärbten Ileumgewebeprobe. Durch MALDI-Imaging lassen sich unterschiedliche Regionen voneinander abgrenzen.

A Lichtmikroskopische Darstellung: Es lassen sich visuell lymphoider Follikel, Tunica mucosa und Bindegewebe abgrenzen. **B** Farbige Kennzeichnung der unter A abgegrenzten Areale. Lymphoider Follikel rot, Tunica mucosa blau, Bindegewebe grün. Die kennzeichnende Farbe entspricht der Farbe des jeweiligen Spektrums unter C. **C** Massenspektren der Proteinexpression in lymphoidem Follikel (rot), Tunica mucosa (blau) und Bindegewebe (grün). Relevante Massepeaks von Peptiden und Proteinen, die präferentiell in einer der Regionen exprimiert werden, sind mit der jeweiligen Farbe bezeichnet. Schwarz umrahmt sind die Massen, deren Verteilung im Gewebe unter E dargestellt ist. **D** 2-dimensionale Darstellung der Spektren unter C. Eine Zeile der Darstellung entspricht jeweils einem Messpunkt mit einem Durchmesser von 30µm. Unten dargestellt Massenspektren der Messpunkte aus lymphoidem Follikel, mittig aus Bindegewebe, oben aus der Tunica mucosa. **E** Darstellung der Verteilung im Gewebe eines Biomoleküls mit der Masse von 4075Da, es ist präferentiell im Bindegewebe exprimiert. Ein Molekül mit der Masse von 4954Da ist verstärkt im lymphoiden Follikel exprimiert und ein Molekül mit der Masse von 12166Da wurde präferentiell in der Tunica mucosa detektiert. Wärmere Farben entsprechen starker Expression, kältere Farben schwacher Expression.

Lediglich die Peptide des Bindegewebes hatten spezifische Massen, die in den Regionen der Tunica mucosa oder des lymphoiden Follikels nicht nachweisbar waren. Interessant ist, dass die im Bindegewebe nachgewiesene Masse von 4075Da auch Bereiche am Rand des Untersuchungsgebietes kennzeichnet, die visuell im Vorfeld nicht als Bindegewebe identifiziert worden waren (Abbildung 14, B und E). Sie konnten erst nach Analyse mittels MALDI-Imaging dieser Region zugeordnet werden. Ein Beispiel für die Verteilung im Gewebe eines Peptids mit der Masse von 4954Da, das präferentiell im lymphoiden Follikel exprimiert wird, ist Abbildung 14 E zu entnehmen. Präferentiell in Tunica mucosa exprimiert ist ein Protein mit der Masse von 12166Da (Abbildung 14 E).

Die Zäkumgewebeprobe (Abbildung 15) wurde ebenso untersucht. Nach lichtmikroskopischer Einteilung des ungefärbten Zäkums in die Regionen lymphoider Follikel, Tunica mucosa und Bindegewebe erfolgte die Analyse mittels MALDI-Imaging. Insgesamt wurden hier 4057 Messpunkte analysiert. Davon befanden sich 365 in der lichtmikroskopisch sicher dem lymphoiden Follikel zuordenbaren Region, 2310 in der Tunica mucosa und 283 im Bindegewebe. Die in Abbildung 15C aufgeführten Massen wurden als präferentiell in lymphoidem Follikel (rot dargestellt), Tunica mucosa (blau dargestellt) oder Bindegewebe (grün dargestellt) exprimiert identifiziert (s.a. Tabelle 2). Insgesamt wurden 6 Peptide bzw. Proteine dem lymphoiden Follikel zugeordnet. Nur 3 Peptide entsprachen den Kriterien für präferentiell in Tunica mucosa exprimierte Proteine. 14 Peptide und Proteine wurden besonders stark im Bindegewebe detektiert. Wie im Ileum sind auch im Zäkum bindegewebsspezifische Proteine eher im niedrigen Massebereich nachweisbar. Proteine der Tunica mucosa hatten eher höhere Massen. In Abbildung 15 E sind beispielhaft die Verteilungen im Gewebe der Peptide und Proteine mit der Masse 14085Da (eher lymphoider Follikel), 10003Da (eher Tunica mucosa) und 6731Da (eher Bindegewebe) abgebildet. In der untersuchten Zäkumgewebeprobe unterschied sich die Proteinexpression lymphoider Follikel und Tunica mucosa eher durch die Intensität der detektierten Massen, weniger durch die Art der Peptide und Proteine. Wie im Ileum war lediglich die Proteinexpression des Bindegewebes qualitativ scharf von der der beiden anderen Regionen zu trennen.

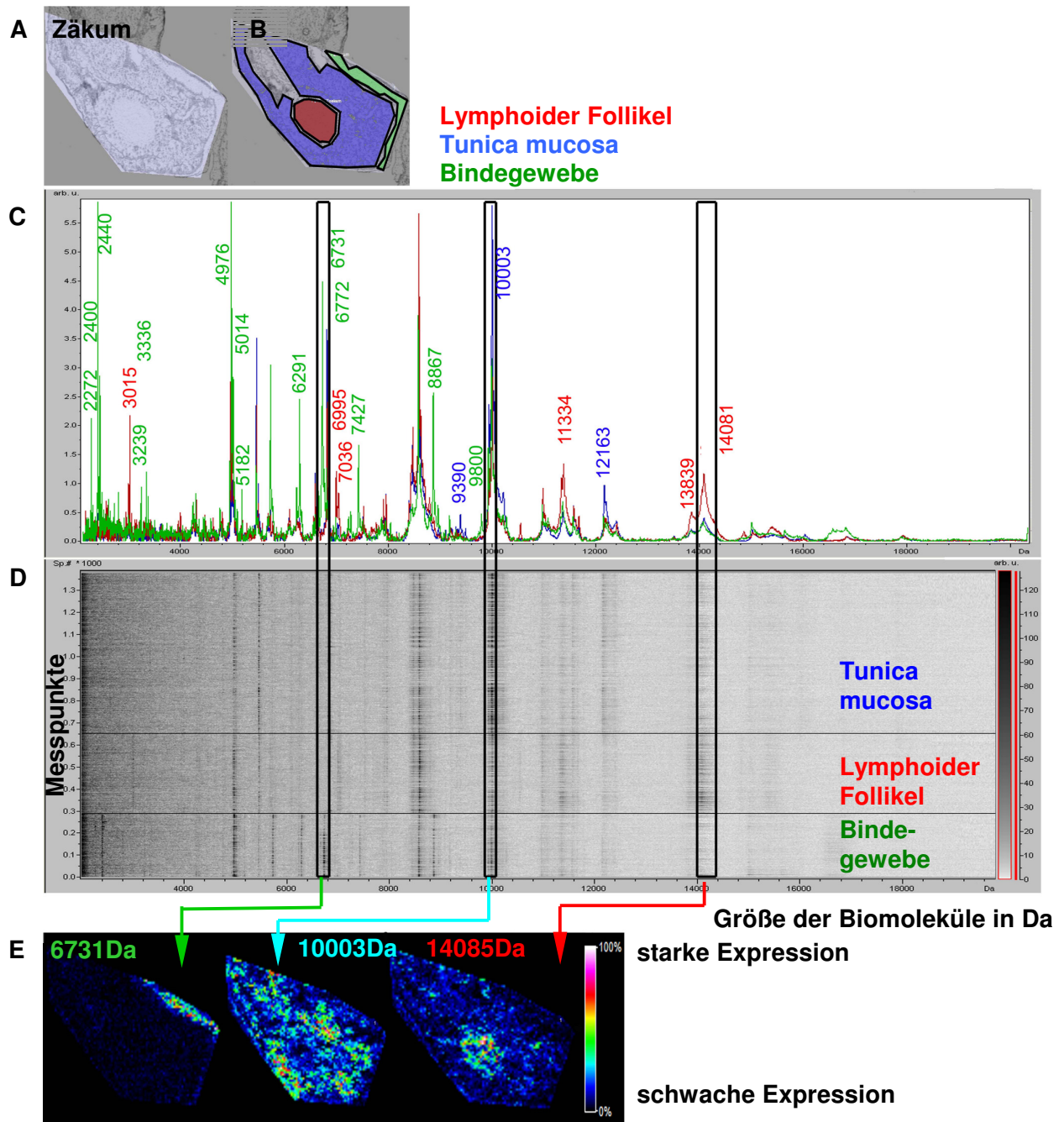


Abbildung 15 MALDI-Imaging eines Zäkumschnittes. Mittels MALDI-Imaging lassen sich unterschiedliche Areale eines Schnittes voneinander abgrenzen.

A Analyse eines ungefärbten Zäkumschnittes. Lymphoider Follikel, Tunica mucosa und Binde- gewebe wurden lichtmikroskopisch abgegrenzt. **B** Farbige Kennzeichnung der unter A abgegrenzbaren Areale. Lymphoider Follikel rot, Tunica mucosa blau, Binde- gewebe grün. Die kennzeichnende Farbe ist entsprechend der Farbe des Massenspektrums unter C. **C** Massenspektren der Expression von Biomolekülen aus den Geweberegionen lymphoider Follikel (rot), Tunica mucosa (blau) und Binde- gewebe (grün). Schwarze gekennzeichnete Massepeaks, deren Verteilung im Gewebe unter E dargestellt ist. **D** 2-dimensionale Darstellung der Massenspektren aus C. Jede Zeile stellt das Spektrum eines Messpunktes mit einem Durchmesser von 30µm dar. Unten dargestellt die Massenspektren aus Binde- gewebe, mittig aus lymphoidem Follikel, oben aus Tunica mucosa. **E** Darstellung der Verteilung der unter C gekennzeichneten Biomoleküle. Moleküle mit einer Größe von 14085Da werden präferentiell im lymphoiden Follikel exprimiert. Moleküle mit einer Größe von 10003Da eher in der Tunica mucosa und Moleküle mit einer Größe von 6721Da werden präferentiell im Binde- gewebe detektiert. Die Häufigkeit der Detektion der jeweiligen Molekülmassen ist farbkodiert. Wärmere Farben bedeuten stärkere Detektion, kühlere Farben geringere Detektion.

Die Expressionsmuster der Regionen lymphoider Follikel, Tunica mucosa und Bindegewebe von Zäkum und Ileum wurden miteinander verglichen (Tabelle 2). Es konnten Massen von Peptiden identifiziert werden, die in beiden Darmabschnitten präferentiell in lymphoidem Follikel oder Tunica mucosa exprimiert werden (Tabelle 2, gerahmt). Dies gilt für 5 der insgesamt 13 Peptide und Proteine, die als präferentiell im lymphoiden Follikel identifiziert wurden und zwei der insgesamt 16 Peptide und Proteine der Tunica mucosa. Bei gleich konfigurierten Peaks wurde in Ileum und Zäkum von identischen Proteinen und Peptiden ausgegangen, wenn sich deren Maxima um weniger als 10Da unterschieden. In Tabelle 2 sind Peptide mit fatter schwarzer Linie gekennzeichnet, deren Maxima identisch sind oder sich um 1Da unterscheiden. Ist der Unterschied zwischen 2Da und 5Da groß, wurden sie mit unfetter schwarzer Linie gekennzeichnet, bei einem Unterschied zwischen 6Da und 10Da mit einer unterbrochenen schwarzen Linie. Überraschend konnte bei den Peptiden, die dem Bindegewebe zugeordnet wurden, keine Übereinstimmung zwischen Zäkum und Ileum festgestellt werden.

Tabelle 2 Mittels MALDI-Imaging lassen sich Peptide identifizieren, die präferentiell in Follikel, Tunica mucosa oder Bindegewebe von Zäkum bzw. Ileum exprimiert werden.

Massepeaks identifiziert in:					
Ileum Follikel	Zäkum Follikel	Ileum Mucosa	Zäkum Mucosa	Ileum Bindegewebe	Zäkum Bindegew.
					2272
					2400
					2440
		2734			
		2957			
2991					
3016	3015				
					3239
					3336
		3492			
		3620			
				3649	
				3668	
				3687	
				4075	
				4093	
				4112	
		4209			
				4243	
				4290	
				4330	
4954					4976
4979					5014
		5072			
		5460			5182
		6591			6291
6988	6995				
					6731
					6772
7038	7036				
		7103			
		7524			7427
		8444			
8468					
8588					
8623					
			9390		8867
					9800
		9935			
		10000	10003		
11340	11334				
11377					
		11571			
		12166	12163		
	13839				
14085	14085				

Die als präferentiell in lymphoiden Follikeln von Zäkum bzw. Ileum exprimiert identifizierten Peptide und Proteine wurden mit den in mesenterialem Lymphknoten und Thymus detektierten Massen verglichen (Abbildung 16, Tabelle 3). Weder im Thymus noch in mesenterialem Lymphknoten konnten lichtmikroskopisch ohne eine Färbung oder durch MALDI-Imaging Proteine detektiert werden, die regionale Verteilungsunterschiede im Gewebe (etwa Mark, Rinde, Keimzentrum) aufwiesen. Thymus und mesenterialer Lymphknoten gingen damit ohne Binnendifferenzierung in die Analyse ein. Die Tunica mucosa des Ileums diente beim Vergleich der lymphoiden Gewebe als nicht-lymphoides Kontrollgewebe. Es wurde deutlich, dass einige Massen wie 7036Da (in Abbildung 16 B und C schwarz markiert), 11330Da (schwarz markiert) und 14085 Da (rot markiert) in allen untersuchten lymphoiden Geweben gehäuft detektiert werden, jedoch nur in geringem Maße in der Tunica mucosa des Ileums. Beispielhaft ist in Abbildung 16 A die Verteilung des Proteins mit der Masse von 14085Da in den verschiedenen untersuchten Geweben dargestellt. Wiederum fällt auf, dass sich in den verschiedenen Geweben die Proteinexpression nicht qualitativ unterscheidet, sondern lediglich verschieden starke Detektion der jeweiligen Peptidmassen festgestellt werden kann. Es wurden präparationsbedingte Unterschiede zwischen den einzelnen Geweben festgestellt. Die Spektrenqualität von mesenterialem Lymphknoten und Thymus war insgesamt deutlich besser als die der beiden Darmabschnitte (Abbildung 16 B, C).

Bei den Analysen aller Gewebe mittels MALDI-Imaging fällt auf, dass die meisten detektierten Peptide eine Masse von <15000Da besitzen. Murines Interleukin-2 besitzt mit 169 Aminosäuren eine Größe von 19400Da (Protein knowledge base, www.uniprot.org). Es befindet sich damit im Grenzbereich der in dieser Analyse detektierten Massen und konnte in keiner Probe nachgewiesen werden. Es wurde versucht, mithilfe des Suchinstrumentes Protein prospector und der Datenbanken SwisProt.2010.03.30 und Protein knowledge base UniProtKB die mittels MALDI-Imaging detektierten Massen bestimmten Peptiden oder Proteinen zuzuordnen. Eine sichere Zuordnung gelang aufgrund etwa der hohen Komplexität der Proben und einer Vielzahl von möglichen posttranslationalen und präparationsbedingten Veränderungen nicht (siehe auch Tabelle 4, Kapitel 4.6).

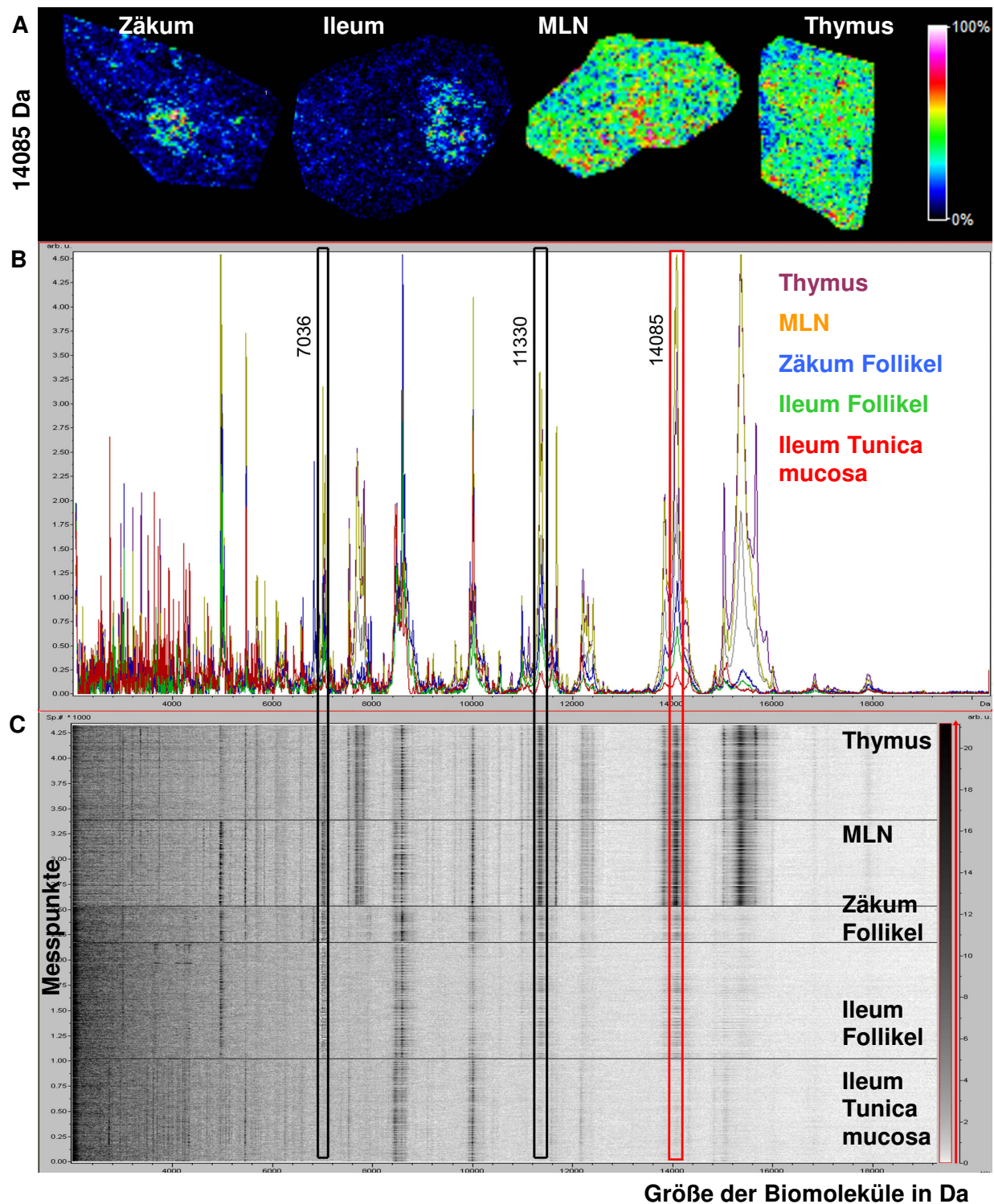


Abbildung 16 Massenspektrometrischer Vergleich der Proteinexpressionsmuster lymphoider Gewebe mit nicht-lymphoidem Gewebe

A Verteilung der Masse von 14085 Da in Ileum, Zäkum, MLN und Thymus. Das Protein wird präferentiell in lymphoiden Geweben exprimiert. Die Expression des Proteins ist farbkodiert. Wärmere Farben bedeuten stärkere Expression, kältere geringere Expression. **B** Massenspektren der Proteinexpression von Thymus (lila), MLN (orange), Zäkum Follikel (blau), Ileum Follikel (grün) im Vergleich zu Ileum Tunica mucosa (rot). Der rote Kasten kennzeichnet die Masse von 14085 Da, deren Verteilung im Gewebe unter A dargestellt ist. Schwarz gekennzeichnet sind Moleküle mit den Massen 7036 Da bzw. 11330 Da. Diese werden ebenfalls präferentiell in lymphoidem Gewebe exprimiert. **C** 2-dimensionale Darstellung der Massenspektren aus B. Eine Zeile steht jeweils für einen Messpunkt. Dargestellt sind von oben nach unten die Massenspektren von Thymus, MLN, Zäkum Follikel, Ileum Follikel und zum Vergleich Ileum Tunica mucosa.

Tabelle 3 Es lassen sich Massen identifizieren, die spezifisch in lymphoidem Gewebe exprimiert werden.

Massepeaks identifiziert in				
Ileum Follikel	Zäkum Follikel	MLN	Thymus	Ki67 ⁺ Einzelzellen des MLN
2991			2953	
3016	3015		3015	
			3194	
			3358	
			3506	
		3737	3736	
4954		4949	4952	
4980		4975		
		5017		
		5458	5460	5457
			5669	5666
			5689	5686
			5770	
		5839	5841	
			6065	
			6099	
			6557	
		6591	6590	6587
		6920	6922	
6988	6995	6996	6998	
				7017
7038	7036	7041	7042	7031
		7519	7519	
		7681	7679	
		7768	7773	
		7812	7819	7810
8468				
8588		8583	8587	8580
8623				
		10000	10003	
		10974		
11340	11334	11329	11335	11330
11377		11371	11374	11371
		12197	12201	
		12289		
			12304	
		12403		
	13839	13843	13838	13831
		14040	14045	14033
14085	14085	14085	14081	14075
		15027	15024	
			15353	
		15367	15660	15359

3.8.2. MALDI-Imaging nach Schnelfärbung Ki67⁺ Zellen mit Streptavidin

Um eine Proteinexpressionsanalyse Ki67⁺ proliferierender Zellen zu ermöglichen, war deren Markierung notwendig. Dabei sollte das Gewebe geschont werden und die massenspektrometrische Messung durch die Kennzeichnung der Ki67⁺ Zellen in

geringstmöglichem Maß verfälscht werden. Proliferierende Zellen unterscheiden sich ungefärbt nicht von Ki67⁻ nicht proliferierenden Zellen. Eine Messung mittels MALDI-Imaging ist nach Färbung mit Hämatoxylin/Eosin, bei der sich in Mitose befindende Zellen eventuell sichtbar würden, nicht mehr möglich. Deshalb sollten Ki67⁺ Zellen immunhistochemisch mit Streptavidin markiert werden. Dies geschah mit einem modifizierten Protokoll der von Dr. Norman Händel und Mario Heindl entwickelten Ki67-Schnellfärbung (siehe 2.5.4.).

Streptavidin ist ein homotetrameres Protein mit Untereinheiten von jeweils 183 Aminosäuren Länge und einer Größe von 18834Da (Protein knowledge base). Bedingt durch die Laserenergie sollte es in seine Untereinheiten zerfallen und damit in dem mittels MALDI-Imaging analysierten Massebereich liegen. Streptavidin sollte daraufhin als Masse-Tag für Ki67⁺ Zellen dienen. Eine Zäkumgewebeprobe wurde mit Streptavidin gefärbt und mittels MALDI-Imaging analysiert. Insgesamt sind 4262 Messpunkte in die Untersuchung einbezogen worden. Davon befanden sich 153 in der im Vorfeld lichtmikroskopisch bestimmten Region des lymphoiden Follikels und 3457 in der Region der Tunica mucosa. Bindegewebe konnte lichtmikroskopisch nicht eindeutig abgegrenzt werden. Es kam zu mäßigen Signalverlusten nach Färbung mit Streptavidin (vergleiche Abbildung 15 C und Abbildung 17 C). 2 der 6 Peptide und Proteine, die im ungefärbten Zäkum dem lymphoiden Follikel zugeordnet wurden, wurden auch nach Färbung mit Streptavidin verstärkt in dieser Region detektiert. Keines der Peptide, die in ungefärbtem Zäkum als präferentiell in der Tunica mucosa identifiziert worden waren, war nach Färbung mit Streptavidin noch nachweisbar.

Streptavidin als reines Protein auf einem Objektträger ließ sich massenspektrometrisch nicht nachweisen. Sowohl in der untersuchten Zäkumgewebeprobe (Abbildung 17 E) als auch der Ileumprobe (nicht gezeigt) war eine dem Streptavidin entsprechende Masse von 18834Da nicht nachweisbar. In einem Vorversuch konnte die Funktion des biotinylierten anti-FITC Sekundärantikörpers mittels Meerrettichperoxidase-konjugiertem Streptavidin und DAB nachgewiesen werden. Das fehlende Signal der Untereinheit des Streptavidins ist also nicht mit einer mangelhaften Markierung Ki67⁺ Zellen begründbar. Damit ist eine Untersuchung der Expressionsmuster von Einzelzellen nach Ki67-Färbung mit Streptavidin nicht möglich.

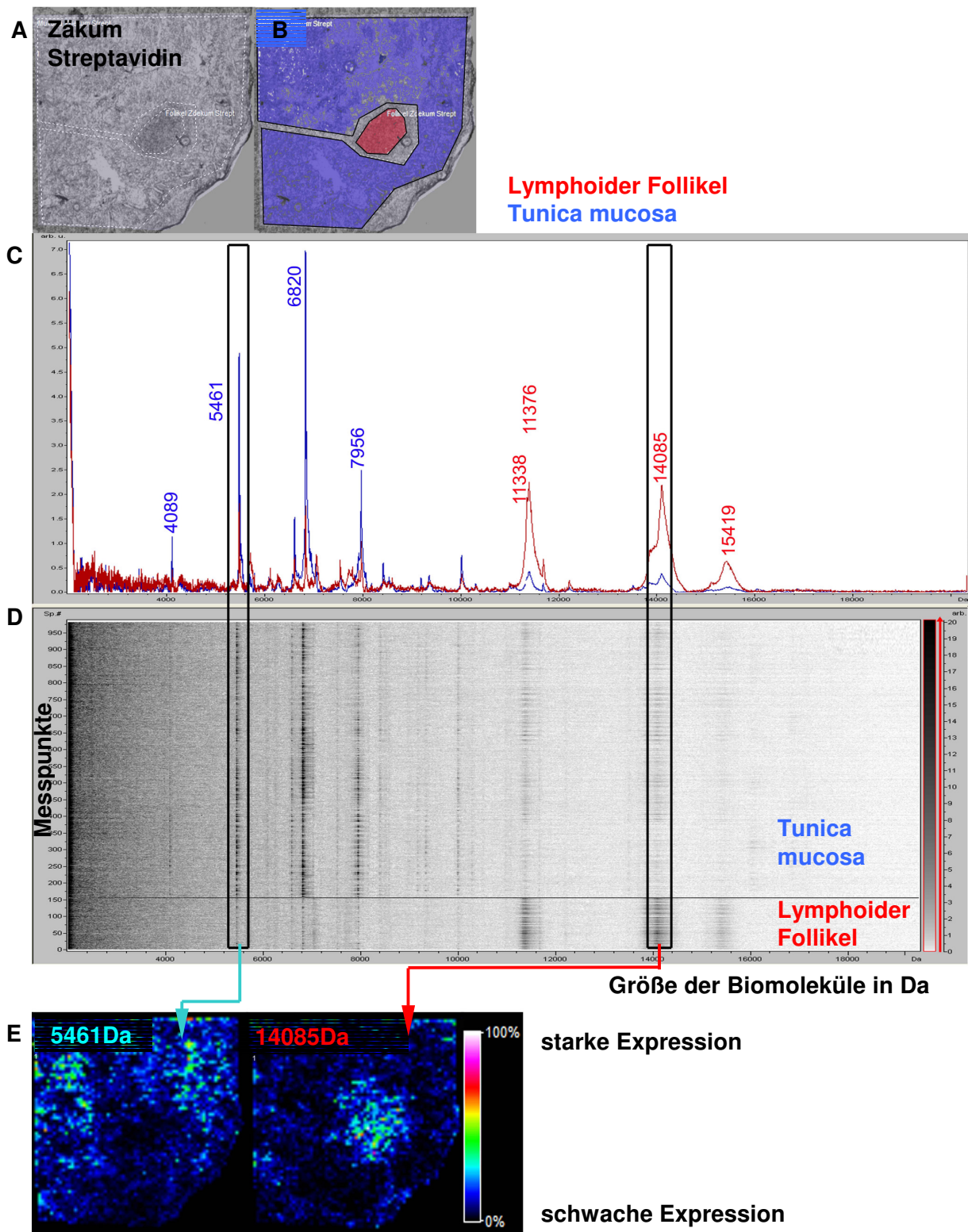


Abbildung 17 MALDI-Imaging des Zäkums nach Markierung Ki67⁺ Zellen mit Streptavidin

A Ki67⁺ Zellen wurden mit Streptavidin markiert, dieses sollte als Masse-Tag dienen. **B** Visuelle Einteilung der Areale lymphoider Follikel (rot) und Mucosa (blau). **C** Massenspektrometrische Darstellung der Proteinexpression von lymphoidem Follikel (rot) und Tunica mucosa (blau). Die Verteilung der schwarz gekennzeichneten Massepeaks im Gewebe ist in E dargestellt. **D** 2-dimensionale Darstellung der Massenspektren aus C. Eine Zeile entspricht dabei einem Messpunkt mit dem Durchmesser von 30µm. Unten dargestellt Massenspektren der Messpunkte aus lymphoidem Follikel, oben aus Tunica mucosa. **E** Rechts Darstellung der Verteilung im Gewebe eines Biomoleküls mit der Masse 14085Da, das präferentiell im lymphoiden Follikel exprimiert wird. Links Verteilung des Moleküls mit der Masse von 5461Da. Dieses wird bevorzugt in der Tunica mucosa detektiert.

3.8.3. Analyse der Massenspektren von Einzelzellen mittels MALDI-Imaging

Alternativ zur Färbung mit Streptavidin wurde die Analyse mittels MALDI-Imaging nach immunhistochemischer Schnelfärbung Ki67⁺ Zellen mit dem Chromogen DAB evaluiert. Dafür wurden Gewebeproben mesenterialen Lymphknotens benutzt. Die berechnete Molekülmasse von DAB beträgt 214Da. DAB im durch die Firma Dako vorgesehenem Lösungsmittel hat einen deutlichen Massepeak bei 423Da. Nach immunhistochemischer Färbung wurden manuell 201 Ki67⁺ Zellen, 297 Ki67⁻ Kontrollzellen und 97 Ki67⁺ Zellen des Keimzentrums als Messpunkte definiert (Abbildung 18 A, B, Messpunkte hell markiert). Jeder der Messpunkte hatte einen Durchmesser von 10µm. Die resultierenden Massenspektren zeigen monomorphe Signale in einem Massebereich <4000Da. Diese können auf DAB zurückgeführt werden. Insgesamt war die Spektrenqualität nach Färbung mit DAB reduziert. Die für lymphoides Gewebe typischen Massepeaks z.B. bei 7031Da, 11330Da und 14085Da waren jedoch weiterhin nachweisbar und mit einem Quotienten Signal/Hintergrundrauschen ≥ 5 relevant. Es ließ sich jedoch zwischen Ki67⁺ und Ki67⁻ Zellen weder ein deutlicher Unterschied der Art der exprimierten Proteine noch ihrer Expressionsintensität nachweisen (Abbildung 18 C, D). Auch im Massespektrum der Ki67⁻ Zellen traten die DAB-bedingten Artefakte im Massebereich <4000Da auf. Auffällig war, dass die Spektrenqualität und Signalstärke Ki67⁺ Zellen des Keimzentrums deutlich schlechter war als die der nicht-Keimzentrums Ki67⁺ Zellen (Abbildung 18 C, D). Die Spektrenqualität hängt somit nicht allein von der Färbung mit DAB ab. Eine murinem IL-2 entsprechende Molekülmasse von 19400Da ließ sich auch in dieser Untersuchung in keinem der Spektren nachweisen. Die Einzellanalyse von immunhistochemisch mit DAB gefärbten Ki67⁺ Zellen eines Thymus zeigte ähnliche Ergebnisse (hier nicht gezeigt). Die Methode MALDI-Imaging ist somit zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht geeignet, Proteinexpressionsunterschiede zwischen Ki67⁺ und Ki67⁻ Einzelzellen nachzuweisen. Mögliche Gründe hierfür sind in Kapitel 4.6 und Tabelle 4 aufgeführt. Eine immunhistochemische Färbung von Geweben nach Analyse mittels MALDI-Imaging ist im Grunde möglich. Bedingt durch den geringen Laserdurchmesser und die geringen Abstände zwischen den einzelnen Messpunkten kam es jedoch zu einer starken Gewebeabtragung. Eine immunhistochemische Färbung der mittels MALDI-Imaging analysierten Gewebe war somit nicht sinnvoll.

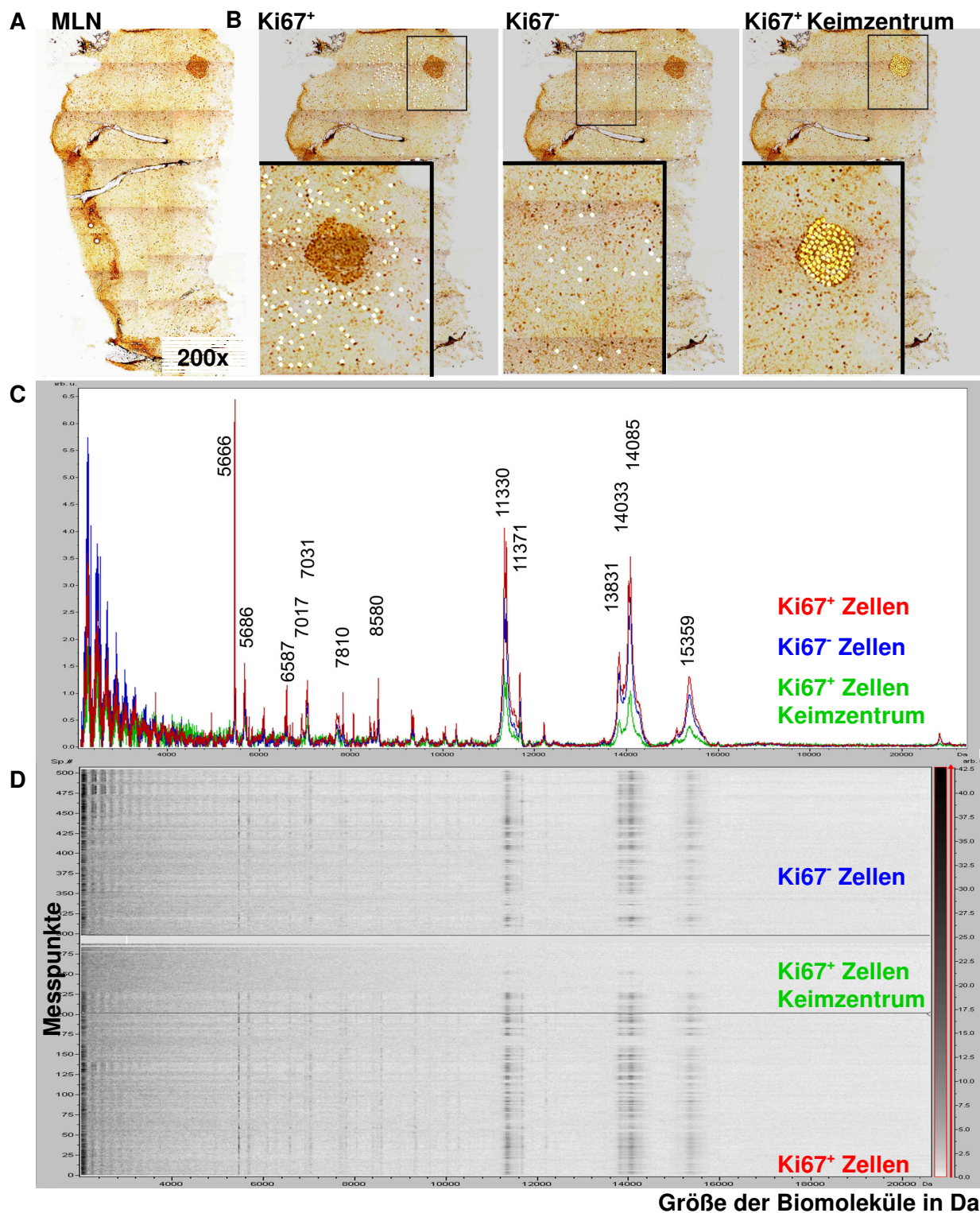


Abbildung 18 MALDI-Imaging, Einzelzellanalyse eines mesenterialen Lymphknotens mit DAB-Färbung Ki67⁺ Zellen

A Mesenterialer Lymphknoten, immunhistochemische Färbung Ki67⁺ Zellen mit DAB (braun). Die Originalvergrößerung betrug 200x. **B** Messpunkte für Zellen, deren Proteinexpression mittels MALDI-Imaging untersucht wurden, sind hell markiert. Links dargestellt Messpunkte der Ki67⁺ Zellen, mittig Ki67⁻ Zellen, rechts Ki67⁺ Zellen des Keimzentrums. **C** Massenspektren Ki67⁺ Zellen (rot), Ki67⁻ Zellen (blau) und Ki67⁺ Zellen des Keimzentrums (grün). Bezeichnet sind Protein- und Peptidgrößen mit relevanten Massepeaks. **D** 2-dimensionale Darstellung der Massenspektren aus C. Eine Zeile entspricht einem Messpunkt. Spektren Ki67⁺ Zellen sind unten dargestellt, mittig Massespektren der Ki67⁺ Keimzentrumzellen, oben Ki67⁻ Kontrollzellen.

4. Diskussion

4.1. Applikation von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex hat keine fatalen Nebenwirkungen

Die Mehrzahl der vorliegenden Studien zum therapeutischen Nutzen von IL-2 hat eine Expansion von Effektor-T-Zellen, etwa bei Nierenzellkarzinom, metastasierendem Melanom oder HIV-Infektion zum Ziel. Damit soll die Immunantwort des Patienten gegen die Tumoren oder pathogene Antigene angeregt werden¹¹⁹⁻¹²¹. IL-2 hat eine Halbwertszeit von nur etwa sieben Minuten¹²². Um einen therapeutischen Effekt zu erzielen, erfolgt die Applikation in hohen Dosen. Dabei treten teils erhebliche Nebenwirkungen wie Fieber, Hypotension und Capillary leak Syndrom auf. Dieses äußert sich etwa durch generalisierte Ödeme und kann zu Multi-Organ-Versagen führen⁵⁷. Eine Behandlung mit IL-2 führt bei den genannten Tumoren bei nur etwa 10 bis 20% der behandelten Patienten zur Besserung des Verlaufs^{119,120,123}. Applikation von IL-2 bei Patienten mit HIV führt zur signifikanten Steigerung der Zahl CD4⁺ Zellen. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf die Zahl opportunistischer Infektionen oder das Überleben der Patienten¹²¹. Eine wahrscheinliche Ursache für den fehlenden klinischen Effekt einer IL-2-Behandlung sowohl beim Nierenzellkarzinom als auch bei HIV-Infektion ist die Expansion regulatorischer T-Zellen durch IL-2^{121,124}.

Zur Verhinderung einer Abstoßungsreaktion nach Organtransplantation oder zur Behandlung von Autoimmunsyndromen ist ein Behandlungsansatz die Expansion regulatorischer T-Zellen. Zur präferentiellen *in vivo* Expansion von regulatorischen T-Zellen ist die Nutzung von rekombinantem IL-2 bedingt durch die genannten Nebenwirkungen, die Expansion von Effektor-T-Zellen und die geringe Halbwertszeit nicht geeignet. In verschiedenen Studien wurde deshalb eine *ex vivo* Expansion z.B. von mittels FACS aufgereinigten regulatorischen T-Zellen versucht¹²⁵. Aufgrund der intranukleären Lokalisation des wichtigsten Markers für regulatorische T-Zellen Foxp3 und der Notwendigkeit der Zellpermeabilisation für seine Färbung ist eine Aufreinigung regulatorischer T-Zellen nicht in ausreichendem Maße möglich. Zudem wird Foxp3 beim Menschen zeitweise auch in nicht regulatorischen T-Zellen exprimiert¹²⁵. Für die Selektion und *in vitro* Expansion müssen also andere Marker für regulatorische T-Zellen wie etwa CD25 genutzt werden. CD25 wird jedoch ebenfalls von aktivierten Effektor-T-Zellen exprimiert. Eine Möglichkeit, die ungewollte Expansion von nicht-regulatorischen T-Zellen zu umgehen, wäre die Induktion eines regulatorischen Phänotyps bei Effektor-T-Zellen durch TGF- β , IL-2 und Retinsäure³⁹. *Ex vivo* expandierte regulatorische T-Zellen haben jedoch nicht immer die gewünschten Eigenschaften wie etwa eine dauerhafte Expression von Foxp3¹²⁶. Die Nachteile einer *ex vivo* Expansion bzw. Induktion regulatorischer T-Zellen sollten in der vorliegenden Arbeit umgangen werden.

Durch Boyman et al. wurde erstmals eine Expansion regulatorischer T-Zellen *in vivo* durch Applikation eines IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex beschrieben⁵⁹. Dieser Antikörperkomplex wurde in der vorliegenden Arbeit benutzt. Zur Expansion regulatorischer T-Zellen mittels IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex ist eine vorsichtige Dosiseinstellung notwendig. Aufgrund der starken Expression von CD25 durch regulatorische T-Zellen sind bereits relativ geringe Mengen von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex ausreichend^{127,128}. Effektor-T-Zellen werden bei höheren Dosen ebenfalls in Aktivität und Proliferation gefördert. Dies erklärt die gegensätzliche Wirkung von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex bei geringen und hohen Applikationsmengen. Bei geringer Dosierung verhindert IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex den Beginn eines Autoimmundiabetes bei NOD-Mäusen. Hingegen tritt bei hohen Dosen ein Diabetes zu einem früheren Zeitpunkt ein¹²⁷. Die Expression von CD25 der Effektor-T-Zellen wird durch höhere Dosen von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex angeregt, womit deren Aktivität steigt. Ein positiver Feedbackmechanismus setzt ein. Dieser kann zunächst nicht von regulatorischen T-Zellen durchbrochen werden^{128,129}.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ermittelt, ob die bei Hochdosistherapie mit IL-2 allein bzw. mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex beobachteten Nebenwirkungen ebenfalls bei Applikation von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex in geringer Dosis auftreten. Nach Applikation von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex wurde keine Änderung des Gewichts behandelter Tiere beobachtet. Eine deutliche Verschlechterung des Allgemeinzustandes und damit einhergehende Gewichtsabnahme bedingt durch IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex Behandlung konnte so ausgeschlossen werden. Auch massive Ödembildung im Rahmen eines Capillary leak Syndroms trat nicht auf. Eine gesteigerte Entzündungsaktivität im Kolon nach IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex Applikation wurde histologisch mithilfe eines Kolitis-Scores ausgeschlossen. Eine relevante Expansion von Effektor-T-Zellen im Kolon bzw. ihre Einwanderung aus peripheren lymphatischen Organen von behandelten Versuchstieren kann damit ausgeschlossen werden. In weiteren Experimenten soll die Wirkung von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex auf das Proliferations- und Suppressionsverhalten regulatorischer T-Zellen in der Entzündungssituation einer Kolitis untersucht werden.

Stallmach et al. wiesen die Wirkung eines IL-2/IgG2b-Fusionsproteins auf eine durch TNBS induzierte Kolitis nach. Wurden Tiere vor Induktion der Kolitis mit IL-2/IgG2b-Fusionsprotein behandelt, litten sie nicht an Gewichtsverlust und ihre Überlebensrate war signifikant höher als die der Vergleichsgruppe. Eine Behandlung nach Induktion der Kolitis führte ebenfalls zu signifikant weniger Gewichtsverlust und zur Steigerung der Überlebensrate¹¹⁴. In Vorexperimenten zur vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse nicht nachvollzogen werden. Ein Einfluss von IL-2/IgG2b-Fusionsprotein auf Gewichtsverlust oder

Überlebensrate der behandelten Tiere nach Induktion einer TNBS-Kolitis wurde nicht festgestellt. Die von uns erwartete Steigerung der Proliferation regulatorischer T-Zellen durch den Agonisten des IL-2-Rezeptors IL-2/IgG2b-Fusionsprotein in lymphoiden Follikeln des Kolons oder der Lamina propria mucosae behandelter Mäuse konnte nicht nachgewiesen werden. Von Boyman et al. wurde berichtet, dass die Wirkung von IL-2-Fusionsproteinen weniger ausgeprägt ist als die von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex⁵⁹.

4.2. IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex führt zur präferentiellen Expansion regulatorischer T-Zellen in mesenterialen Lymphknoten, Milz und Kolon

Bei mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelten Tieren fiel makroskopisch eine Splenomegalie und vergrößerte mesenteriale Lymphknoten auf. IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex hat somit einen lymphoproliferativen Effekt. Der Phänotyp der expandierten Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Es ergab sich eine Steigerung des Anteils CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen bei mesenterialem Lymphknoten auf das 5- bzw. 7-fache im Vergleich zu mit Isotyp-Kontrolle behandelten Tieren und unbehandelten Kontrolltieren. Bei Milzen war der Anteil regulatorischer T-Zellen gegenüber der Isotyp-Kontrolle auf das 5-fache, gegenüber der unbehandelten Kontrolle sogar auf das 12-fache erhöht. Die Expansion regulatorischer T-Zellen liegt damit in einem Bereich, der auch in einer anderen Studie erreicht wurde⁶². Mittels Immunfluoreszenzfärbungen wurde ermittelt, ob auch in lymphoiden Follikeln und der Lamina propria mucosae des Kolons mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelter Tiere regulatorische T-Zellen vermehrt nachgewiesen werden können. Es wurde eine signifikante Steigerung der Zahl regulatorischer T-Zellen in der Lamina propria mucosae, nicht jedoch in lymphoiden Follikeln IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelter Tiere gegenüber Isotyp- bzw. unbehandelten Kontrollen nachgewiesen. Die Steigerung der Zahl regulatorischer T-Zellen ist also bis in die Peripherie behandelter Tiere nachweisbar. Der Anteil regulatorischer T-Zellen im Pool der CD4⁺ T-Zellen wird durch IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex-Applikation gesteigert. Um zu untersuchen, ob die Zunahme der Zahl regulatorischer T-Zellen in der Peripherie bedingt durch eine Einwanderung oder durch lokale Proliferation ist, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von Foxp3 und dem Proliferationsmarker Ki67 vorgenommen. Sowohl in lymphoiden Follikeln als auch in der Lamina propria mucosae ist die Zahl proliferierender regulatorischer T-Zellen signifikant gegenüber den Kontrollen gesteigert. IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex induziert somit die lokale Proliferation regulatorischer T-Zellen. Da die Zahl regulatorischer T-Zellen im lymphoiden Follikel des Kolons IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelter Tiere nicht erhöht ist, ist zu vermuten, dass diese in die Lamina propria mucosae einwandern.

Eine Steigerung der Proliferation regulatorischer T-Zellen im Thymus, Milz oder mesenterialem Lymphknoten nach Applikation von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex und die sekundäre Einwanderung könnte zusätzlich zur lokalen Proliferation zur Erhöhung der Zahl regulatorischer T-Zellen in der Lamina propria mucosae beitragen. Es ist zu vermuten, dass regulatorische T-Zellen auch bei einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung nach Applikation von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex direkt vor Ort präferentiell expandiert werden und das Entzündungsgeschehen positiv beeinflussen können. Die Zahl regulatorischer T-Zellen ist bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen lokal erhöht^{100,130,131}. Grund dafür könnte neben lokaler Proliferation und Induktion regulatorischer T-Zellen ihre Rekrutierung an den Ort der Entzündung sein. Die Ursache des Persistierens der Entzündung trotz lokal erhöhter Zahl regulatorischer T-Zellen muss weiter untersucht werden. Es ist noch nicht ausreichend bekannt, ob die Suppressionsfähigkeit der entzündungsbedingt rekrutierten regulatorischen T-Zellen voll erhalten ist. Ein möglicher Grund für eine Minderung ihrer Suppressionsfähigkeit ist ein lokaler Mangel an IL-2¹²⁷. Dieser könnte durch Applikation von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behoben werden und damit zur Regulation des Entzündungsgeschehens bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beitragen. Um dies zu untersuchen, soll in einem weiterführenden Experiment die Wirkung von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex auf regulatorische T-Zellen nach Induktion einer experimentellen Kolitis untersucht werden. Dieses Experiment wird zeigen, ob durch IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex expandierte regulatorische T-Zellen im Darm einen suppressiven Effekt haben. Webster et al. konnten einen suppressiven Effekt durch IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex expandierter regulatorischer T-Zellen nach Organtransplantation und nach Induktion einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis zeigen⁶². Es konnte gezeigt werden, dass regulatorische T-Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen *in vitro* keine gestörte Suppressionsfunktion besitzen¹⁴. In weiteren Experimenten muss geklärt werden, ob die Suppressionsfunktion regulatorischer T-Zellen lokal in der Lamina propria mucosae des Darms von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gestört ist.

4.3. IL-10 als wichtiger Vermittler der Suppressionsaktivität durch IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex expandierter regulatorischer T-Zellen

Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 ist ein wichtiger Vermittler der Suppressionsaktivität regulatorischer T-Zellen (s.a. 1.6.2.2). IL-10-produzierende regulatorische T-Zellen akkumulieren in der Lamina propria mucosae des Kolons von Versuchstieren¹⁰⁰. Sowohl im T-Zell-Transfer-Modell für Kolitis als auch bei Behandlung von TNBS-Kolitis mit IL-2/IgG2b-Fusionsprotein ist IL-10 von entscheidender Bedeutung^{100,114}. Bei Gabe eines inhibierenden anti-IL-10-Antikörpers waren regulatorische T-Zellen nicht in der Lage, eine induzierte Kolitis

zu kontrollieren. Die Bedeutung von durch regulatorische T-Zellen exprimierten IL-10 nach Induktion einer experimentellen Kolitis und Behandlung mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex soll Gegenstand weiterführender Experimente sein.

Eine Steigerung der Zahl regulatorischer T-Zellen nach Applikation von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex wurde nur über einen Zeitraum von etwa zwei Wochen beobachtet⁶². Mit wiederholter Gabe von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex wurde eine langfristige Steigerung der Zahl regulatorischer T-Zellen erreicht¹³². Eine Kombination verschiedener Expansionsmethoden regulatorischer T-Zellen erscheint sinnvoll, um ihre Zahl und Suppressionsfunktion effektiver und über einen noch längeren Zeitraum zu steigern (s. 1.5). So kann mit Gabe von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex zusammen mit Rapamycin oder Everolimus eine dauerhafte Expansion regulatorischer T-Zellen erreicht werden^{62,132}. Auf diese Weise könnte außerdem die ungewollte Aktivierung CD25⁺ Effektor-T-Zellen durch IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex verhindert werden⁶². Auch eine Kombination von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex und Histon-Deacetylaseinhibitoren könnte den Effekt von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex verstärken. Dies muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

4.4. Expansion regulatorischer T-Zellen beim Menschen: Voraussetzungen und Chancen

Eine Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen beruht gegenwärtig auf dem Konzept der Entzündungshemmung durch Aminosalicylate und Glucocorticoide, der Hemmung der Proliferationsfähigkeit von Effektorzellen etwa durch Azathioprin und Methotrexat und der Hemmung inflammatorischer Zytokine etwa durch Cyclosporin A bzw. TNF- α -Inhibitoren wie Infliximab und Adalimumab^{133,134}. Regulatorische T-Zellen spielen bei diesem Behandlungskonzept keine Rolle. Die Expansion regulatorischer T-Zellen durch Agonisten des hochaffinen IL-2-Rezeptors könnte Grundlage eines neuen Therapieansatzes für Autoimmunsyndrome wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen beim Menschen sein. Dies wäre ein entscheidender Fortschritt besonders für Patienten, die durch eine Behandlung mit Glucocorticoiden und TNF- α -Inhibitoren keine längerfristige Remission erreichen.

Die Expansion regulatorischer T-Zellen beim Menschen setzt eine möglichst geringe Immunogenität des Agonisten des IL-2-Rezeptor $\alpha\beta\gamma$ voraus. Konsequenz kann die Nutzung eines humanisierten anti-IL-2-Antikörpers sein. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von Substanzen mit geringerer Molekülgröße. So genannte small molecules sind nicht oder wenig immunogen und somit besser verträglich. Studien zu Verträglichkeit und klinischem

Nutzen eines agonistisch am hochaffinen IL-2-Rezeptor wirkenden small molecules stehen noch aus.

Mit dem durch Austausch einer Aminosäure modifizierten IL-2 Bay 50-4798 wurde ein Molekül entwickelt, das mit etwa 1000-fach gesteigerter Selektivität an hochaffine IL-2-Rezeptoren $\alpha\beta\gamma$ bindet als unmodifiziertes IL-2¹³⁵. Durch die Modifikation sollte eine Expansion von CD25⁺ aktivierten Effektor-T-Zellen ermöglicht werden, ohne NK-Zellen zur Proliferation anzuregen. Aktivierte NK-Zellen werden als Hauptgrund für die Nebenwirkungen der IL-2 Therapie angesehen. Es wurde jedoch kein Unterschied in Art oder Häufigkeit der Nebenwirkungen von IL-2 und Bay 50-4798 bemerkt^{136,137}. Hingegen wurde ein deutlicher Anstieg von Antikörpern gegen Bay 50-4798 festgestellt¹³⁷. *In vitro* werden CD4⁺CD25⁺ T-Zellen durch Bay 50-4798 moderat expandiert. In Phase I und II Studien an HIV-Patienten sowie Patienten mit Nierenzellkarzinom oder metastasiertem Melanom konnte kein Unterschied gegenüber einer Behandlung mit IL-2 festgestellt werden. Die Halbwertszeit von Bay 50-4798 ist mit zwei Stunden deutlich länger als die von IL-2, jedoch weit unter der von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex. Es ist nicht bekannt, ob der geringe Effekt einer Behandlung von HIV-Infektionen, Nierenzellkarzinom oder Melanom mit Bay 50-4798 durch die Expansion regulatorischer T-Zellen begründbar ist. Aufgrund der Nebenwirkungen und der geringen Halbwertszeit von Bay 50-4798 ist es nicht zur Expansion regulatorischer T-Zellen *in vivo* geeignet.

4.5. Regulatorische T-Zellen akkumulieren an proliferierenden Zellen

Ein relativer Mangel an IL-2 führt bei regulatorischen T-Zellen u.a. zu verminderter Expression von CD25 und des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2. IhreSuppressionsaktivität ist dadurch vermindert^{127,138}. Umgekehrt führt ein vermehrtes Angebot an IL-2 zur Steigerung der CD25-Expression regulatorischer T-Zellen¹²⁷. Eine vermehrte Aktivität und damit IL-2-Ausschüttung von Effektor-T-Zellen bewirkt somit nicht nur autokrin einen positiven Feedbackmechanismus und damit weitere Steigerung ihrer Aktivität. Sie regt parakrin gleichzeitig regulatorische T-Zellen an. IL-2 liegt dabei in ausreichender Konzentration nur in unmittelbarer Nachbarschaft der jeweiligen Effektorzelle vor¹²⁸.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass regulatorische T-Zellen in lymphoiden Follikeln an proliferierenden Effektorzellen akkumulieren. Diese Feststellung kann nicht durch zufällige Verteilung beider Zellpopulationen im Gewebe erklärt werden. Dies wurde durch Vergleich der Kontaktrate mit einem durch ein statistisches Modell berechneten Erwartungswert gezeigt¹¹⁷. Die Ergebnisse bestätigen teils unveröffentlichte Ergebnisse von Dr. Andrea Brockel, Dr. Norman Händel und Mario Heindl¹¹⁷. Die gesteigerte Akkumulation von Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen an Ki67⁺ proliferierenden Zellen könnte Ausdruck der

Abhängigkeit regulatorischer T-Zellen von durch aktivierte Effektorzellen produziertem IL-2 sein (IL-2-Hunger regulatorischer T-Zellen; local fueling¹³⁹). Regulatorische T-Zellen würden dabei aktiv proliferierende T-Zellen aufsuchen, um dort ihren IL-2-Bedarf zu decken. Bei IL-2 defizienten Versuchstieren kann eine Akkumulation regulatorischer T-Zellen an proliferierenden Effektorzellen nicht nachgewiesen werden¹¹³. Weiterhin könnte die Akkumulation Zeichen der Suppressionsaktivität regulatorischer T-Zellen sein, etwa durch Zytokindeprivation⁹⁸. Dabei lösen regulatorische T-Zellen durch Konsum von Zytokinen Apoptose in Effektor-T-Zellen aus⁹⁸. Andere direkt kontaktabhängige Mechanismen der Suppression von Effektor-T-Zellen durch regulatorische T-Zellen (s. 1.6.1) als Ursache für die Steigerung der Kontaktrate beider Zelltypen sind denkbar. Überzufällig hohe Kontaktraten wurden in dieser Arbeit sowohl in lymphoiden Follikeln IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelter Versuchstiere als auch in der Isotyp-Kontrollgruppe und bei unbehandelten Tieren festgestellt. IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex hat eine Halbwertszeit von etwa 24h⁶¹. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich der IL-2-Spiegel nach IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex-Gabe in der Peripherie zum Untersuchungszeitpunkt bereits weitgehend normalisiert hat. Durch die Expansion in der Lamina propria mucosae behandelter Tiere und die Heraufregulation von CD25 könnten regulatorische T-Zellen schnell den lokalen IL-2-Spiegel senken. Somit können bei Versuchsbeendigung ca. 72h nach der letzten IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex-Applikation keine Aussagen über die Akkumulation regulatorischer T-Zellen an proliferierenden Effektorzellen bei stark erhöhtem IL-2-Angebot gemacht werden. Ob IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex die Akkumulation regulatorischer T-Zellen an proliferierenden Effektorzellen in der Peripherie beeinflusst, muss in weiteren Experimenten untersucht werden. Dies könnte durch eine Beendigung des Experimentes wenige Stunden nach der Applikation der letzten IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex Dosis und Immunfluoreszenzfärbung von Foxp3, Ki67 sowie des anti-IL-2-Antikörpers geschehen.

4.6. Nachweis spezifischer Massen in Gewebe und Einzelzellen mittels MALDI-Imaging

MALDI-Imaging ermöglicht die Untersuchung der Proteinexpression von Gewebearealen und Zellen im intakten Zellverband. Dabei können Peptide, Proteine, Lipide und Polymere oder auch kleine Moleküle wie Medikamente analysiert werden. Die Art der analysierten Moleküle kann in begrenztem Maße durch die Art der benutzten Matrix beeinflusst werden. Die Analyse setzt das Wissen um Identität oder Masse der untersuchten Moleküle nicht voraus. Eine Markierung der Moleküle ist nicht zwingend notwendig. Es können Hunderte Moleküle gleichzeitig untersucht werden. Somit ergeben sich zwei mögliche Ansatzpunkte: Die Analyse der Genexpression in bestimmten Gewebearealen und die Untersuchung des Verteilungsmusters eines Proteins oder Peptids mit bekannter Masse.

In dieser Arbeit sollte die Proteinexpression der mikroskopisch abgrenzbaren Gewebeareale lymphoider Follikel, Tunica mucosa und Bindegewebe von Zäkum und Ileum sowie von mesenterialem Lymphknoten und Thymus untersucht und verglichen werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob eine Analyse der Proteinexpression proliferierender Einzelzellen mittels MALDI-Imaging möglich ist. Es konnte gezeigt werden, dass bei Ileum und Zäkum die Proteinexpression in lymphoiden Follikeln, Tunica mucosa und Bindegewebe mittels MALDI-Imaging unterschieden werden kann. Es wurden Biomoleküle bestimmter Größe identifiziert, die präferentiell in einer der genannten Regionen exprimiert werden. Die Ergebnisse der Massenspektrometrie des Mucosa-assoziierten lymphoiden Gewebes wurden mit dem von mesenterialem Lymphknoten und Thymus verglichen. Dabei fiel auf, dass einige Moleküle in allen untersuchten lymphoiden Geweben gehäuft detektiert wurden. Es wurde versucht, die Identität dieser Moleküle mit Hilfe der Datenbanken Protein knowledge base (UniProtKB; www.uniprot.org) und SwisProt.2010.08.10 zu ermitteln. Dies gelang nicht. Folgende Probleme sind bei der Zuordnung von Molekülmassen zu bestimmten Peptiden und Proteinen zu beachten:

1. *Generierung von Molekülbruchstücken bei der Ionisation:* Bei MALDI handelt es sich um eine sogenannte soft-ionization Technik. Damit ist die Wahrscheinlichkeit der Fragmentierung eines Biomoleküls während der Ionisation relativ gering. Man kann somit von der detektierten Masse direkt auf die Masse des Ursprungsmoleküls schließen, wenn man von der einmaligen Ionisierung des Moleküls ausgeht.
2. *Mehrfachionisation eines Moleküls durch UV-Laser und Matrix:* Eine Mehrfachionisierung von Molekülen durch den benutzten UV-Laser ist möglich. Es werden jedoch nie alle Moleküle eines Typs mehrfach ionisiert. Im Massenspektrum zeigen sich damit neben dem Massepeak, welcher die wahre Molekülgröße anzeigt, gleich konfigurierte Massepeaks bei $1/2$, $1/3$ und $1/4$ des wahren Wertes. Mehrfachionisierungen sind somit festzustellen und behindern die Zuordnung von detektierten Massen zu Peptiden lediglich in geringem Maße.
3. *Unbekannter Grad an posttranslationalen Veränderungen der detektierten Biomoleküle:* Um die Identität eines Peptids oder Proteins allein mit der Information seiner Masse zu ermitteln, ist die Kenntnis seiner posttranslationalen Veränderungen, insbesondere Glykosylierung, Acetylierung etc., von Wichtigkeit. Nur so kann es mit Hilfe von Datenbanken identifiziert werden. In dieser Arbeit wurden die möglichen posttranslationalen Veränderungen der Peptide und Proteine, die bestimmten Geweben zugeordnet werden konnten, nicht untersucht.

Eine weitere Möglichkeit, eine durch MALDI-TOF-MS detektierte Masse zu identifizieren ist die MALDI-TOF-TOF-MS-Methode. Hier werden durch MALDI-TOF-MS detektierte Peptide und Proteine in einem zweiten MALDI-TOF-Schritt ein weiteres Mal ionisiert und so in für jedes Molekül spezifische Bruchstücke zerlegt. Die Massen dieser Bruchstücke können wiederum in Datenbanken eingelesen und so einem bestimmten Protein zugeordnet werden. Diese Methode ist für die Analyse der Proteinexpression in heterogenen Proben, wie sie in dieser Arbeit untersucht wurden, nur eingeschränkt geeignet. Hingegen konnte die Identität weniger Phospholipide durch MALDI-TOF-TOF-Imaging ermittelt werden¹⁴⁰. Alternativ könnte ein Verdau mit Trypsin zielführend sein. Durch den Verdau werden größere Peptide und Proteine in detektierbare Abschnitte geteilt. Die Digestion erfolgt an charakteristischen Stellen. Aus der Information über die Masse der detektierten Bruchstücke könnte auf die Ursprungspeptide bzw. -proteine rückgeschlossen werden¹⁴¹.

Einfacher als die Ermittlung der Identität von unbekannten Massen, erscheint die Analyse des Verteilungsmusters eines bestimmten bekannten Peptids oder Proteins. Ziel dieser Arbeit war der Nachweis der Expression von IL-2 durch proliferierende Zellen. Damit sollte die These untermauert werden, dass regulatorische T-Zellen sich an proliferierende T-Zellen anlagern, um dort ihren IL-2-Bedarf zu decken (local fueling¹³⁹). Zunächst wurde die Methode an Gewebeschnitten evaluiert. Murines IL-2 hat eine Masse von 19400Da (Protein knowledge base www.uniprot.org). Die Probenvorbereitung ist bei MALDI-Imaging von entscheidender Bedeutung (s.a. Tabelle 4). Die meisten der in dieser Arbeit mittels MALDI-Imaging detektierten Massen sind <10000Da. Eine Masse von 19400Da konnte in keiner der analysierten Proben nachgewiesen werden. Mögliche Ursachen hierfür ist die Wahl einer nicht optimalen Matrixsubstanz. Sinapinsäure zeichnet sich durch eine gute Löslichkeit für größere Peptide aus. Deshalb wurde sie in den dargestellten Experimenten verwendet. Weitere Experimente könnten die Eignung anderer Matrixsubstanzen bzw. -mischungen klären. Die Ionisationsfähigkeit und damit die Detektionsfähigkeit eines zu untersuchenden Moleküls ist sowohl abhängig von der Struktur des Moleküls selbst als auch von anderen in der Probe vorhandenen Molekülen. So sind basische Peptide und Proteine bessere Protonenakzeptoren als andere Moleküle. Werden einige Moleküle um ein Vielfaches besser ionisiert als andere, so können letztere nicht oder nur in geringem Maße nachgewiesen werden. In der Regel lassen sich kleinere Moleküle besser ionisieren als größere. Durch Waschen der Proben z.B. in Ethanol kann die Menge von kleinen Molekülen verringert werden. Eine Optimierung des Waschprotokolls könnte die Detektion von IL-2 in den hier untersuchten Proben verbessern.

Um eine IL-2-Expression durch Ki67⁺ proliferierende Zellen nachzuweisen, sollten diese markiert werden. Dafür wurde die Eignung zweier Markierungsmethoden untersucht. Zunächst wurden Ki67⁺ Zellen des mesenterialen Lymphknotens immunhistochemisch mit dem Chromogen DAB gefärbt. Die gefärbten Proben wurden mittels MALDI-Imaging analysiert. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der Qualität des Massenspektrums durch die Färbung von Ki67 mit DAB. Um dies zu umgehen, wurde versucht, Ki67 mit Streptavidin zu markieren. Streptavidin ist ein homotetrameres Protein. Die Untereinheiten haben eine Molekülmasse von jeweils 18834Da (Protein knowledge base, www.uniprot.org). Die Hoffnung war, dass bedingt durch die Energie des genutzten Lasers Streptavidin monomerisiert werden würde und durch einen eindeutigen Massepeak Ki67⁺ Zellen kennzeichnen würde. Streptavidin war gewählt worden, da es im Gegensatz zu Avidin nicht glykosyliert vorliegt. Leider konnte in der Analyse der markierten Proben Streptavidin nicht nachgewiesen werden. Erklärung hierfür könnte eine insuffiziente Monomerisierung des Proteins sein. Ein weiterer möglicher Grund ist eine gegenüber anderen in der Probe enthaltenen Molekülen schlechtere Ionisierbarkeit. In einem Vorexperiment war die Funktionsfähigkeit der benutzten Antikörper gezeigt worden. Die Spektrenqualität bei Markierung von Ki67 mit Streptavidin war besser als nach immunhistochemischer Färbung. Aufgrund der fehlenden Nachweisbarkeit von Streptavidin durch MALDI-TOF-MS in dieser Arbeit musste für die Einzelzellanalyse der Proteinexpression proliferierender Zellen auf Proben nach immunhistochemischer Färbung von Ki67 mit DAB zurückgegriffen werden. Dabei konnten keine Unterschiede der Proteinexpression zwischen Ki67⁺ und Ki67⁻ Kontrollzellen ermittelt werden. Eine Zusammenstellung der möglichen Probleme und Lösungsansätze bei der Einzelzellanalyse mittels MALDI-Imaging ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Von besonderer Bedeutung für die Einzelzellanalyse ist die laterale Auflösung. Diese wird beeinflusst von der Zahl, Größe und dem Abstand der analysierten Gewebepunkte, der Größe der Matrixtropfen und der resultierenden Kristalle. Die Größe der Matrixtropfen ist vom Lösungsmittel und der Methode des Auftropfens abhängig. Vom Hersteller des Matrix-Präparationsgerätes Image Prep Bruker Daltonik wird eine durchschnittliche Tropfengröße von 20µm angegeben. Je nach Präparationsmethode ist von einer Größe der Matrixkristalle von etwa 20µm bis 50µm auszugehen (persönliche Kommunikation mit Dr. Michael Becker, Bruker Daltonik). Der Abstand zweier Messpunkte betrug ca. 10µm. Eine räumliche Auflösung von unter 20µm ist bei diesen Bedingungen nicht zu erwarten, auch wenn der Laser dies theoretisch erlauben würde. Eine gerichtete Einzelzellanalyse ist unter diesen Umständen und bei einer durchschnittlichen T-Zellgröße von etwa 10µm schwierig. Ursache für die fehlende Detektion von Unterschieden der Proteinexpression Ki67⁺ und Ki67⁻ Einzelzellen wäre außerdem eine mögliche laterale Abweichung von mit Hilfe der

Gerätestuerung definiertem Messpunkt und tatsächlicher Lage der jeweiligen Zelle. Konsequenz wäre eine Modifikation der Gewebepräparation, etwa durch die Stretched Tissue-Methode¹⁴². Hier werden die geschnittenen Gewebeproben auf eine elastische Membran aufgebracht. Es wird Zug auf die Membran ausgeübt. Auf diese Weise sollen die Zellen des Gewebes möglichst vereinzelt werden. Dadurch kann die laterale Auflösung gesteigert werden. Die Kontaktfläche mit der Matrix vergrößert sich und gewährleistet eine optimale Lösung der in den Zellen enthaltenen Peptide¹⁴².

Verschiedene Studien haben die Analyse der Proteinexpression von Einzelzellen zum Ziel¹⁴³. Die Mehrzahl der Studien isoliert die zu untersuchenden Zellen vor Analyse mit MALDI-Imaging aus dem Zellverband. Dies kann z.B. durch Mikrodissektion oder Aufnahme in eine Kapillare nach Homogenisation des Gewebes geschehen. Dadurch können Informationen über die Lage der analysierten Zellen und deren etwaige Interaktion mit Nachbarzellen nicht generiert werden. Andere Gruppen arbeiten mit sehr großen Zellen wie verschiedenen Pflanzenzellen¹⁴⁴ oder den Neuronen der Meeresschnecke *Aplysia californica*¹⁴⁵. In letzteren war sogar eine Analyse der Verteilung von Peptiden und Lipiden innerhalb der Zelle möglich. Das Problem der Analyse der Proteinexpression von Einzelzellen im intakten Zellverband von Säugetiergeweben bleibt in weiteren Experimenten zu bearbeiten. Durch Einzelzellanalyse könnten Erkenntnisse aus *in vitro* Experimenten *in situ* verifiziert werden. Eine Untersuchung der Interaktion mit Nachbarzellen würde ermöglicht. Auch in Zusammenhang mit der untersuchten Zelle unerwartete oder unbekannte Proteine könnten mittels MALDI-Imaging gefunden werden.

Tabelle 4 Lösungsansätze für Probleme im Zusammenhang mit der Analyse kleiner Gewebeareale und Einzelzellen mittels MALDI-Imaging.

Problem	mögliche Lösung oder Lösungsansatz
Degradation von Proteinen durch gewebeeigene Enzyme	Zügige Präparation und rasches Gefrieren der Proben in flüssigem Stickstoff oder mithilfe von Isopropanol und Trockeneis ¹⁴⁶
Laterale Diffusion von Proteinen und Peptiden bei Wasch- und Fixationsschritten oder nach Aufbringen der Matrixsubstanz, daraus resultierende geringe räumliche Auflösung	Kühlung der Wasch- und Fixationsreagenzien, z.B. des Ethanols auf -40°C Sorgfältiges, möglichst automatisiertes Aufbringen der Matrix mit geringstmöglicher Tropfengröße Trocknen der Matrix vor jedem Beschichtungsschritt, um ein Zusammenfließen der Tropfen zu verhindern Eventuell Anwendung der Stretched Tissue Methode ¹⁴²
Interferenz von Chromogenen immunhistochemischer Färbungen mit der massenspektrometrischen Analyse	Analyse von Zellen, die sich morphologisch abgrenzen lassen Nutzen einfacher histologischer Färbungen wie Methylenblau oder Kresylviolett (nicht HE), die mit MALDI-Imaging kompatibel sind ¹⁴⁷ Nutzen anderer Markierungssysteme wie durch Laser abspaltbare Masse-Tags ¹⁴⁸ , Gold oder Biomolekülen definierter Größe Färbung im Anschluss an MALDI-Imaging.
Keine oder marginale Detektion des gesuchten Proteins oder Peptids	Optimierung der Probenpräparation, der Wasch- und Fixationsschritte Wahl der optimalen Matrix ¹⁴⁹ .
Laser trifft markierte Zelle mit unbekannter und/oder ungenügender Genauigkeit.	Optimierung der Lasereinstellungen Analyse eines Modellgewebes mit definierten Proteinen in den einzelnen Zellen zur Evaluation der Lasereinstellungen Erhöhung der lateralen Auflösung durch Steigerung der Zahl analysierter Gewebepunkte/Fläche
Ungenügende Eindeutigkeit der Zuordnung einer detektierten Masse zu einem bestimmten Peptid oder Protein	Verringerung der Komplexität der Messergebnisse durch vorherige Auswahl (visuell, mittels Färbung oder anderer Markierung) Nutzen von Gewebsmikroarrays z.B. aus Feinnadelbiopsaten, oder von durch Mikrodisektion gewonnenem Gewebe ¹⁴⁴ Verdau eines Folgeschnitts mit z.B. Trypsin, um detektierte Massen sicherer einem Peptid zuordnen zu können ¹⁴¹

5. Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Expansion regulatorischer T-Zellen mittels eines IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplexes

eingereicht von Emanuela Klein

angefertigt an der Universität Leipzig, Klinik und Poliklinik für Kinder und Jugendliche

betreut von PD Dr. med. habil. Holm H. Uhlig

eingereicht am

Für das Gleichgewicht des intestinalen Immunsystems spielen Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen eine essentielle Rolle. Der Transkriptionsfaktor Foxp3 hemmt die Expression von IL-2. Regulatorische T-Zellen sind damit nicht in der Lage, selbst IL-2 in ausreichendem Maße zu exprimieren. IL-2 ist jedoch für die Aufrechterhaltung der Suppressionsaktivität und Homöostase dieser Zellen notwendig. Regulatorische T-Zellen sind somit auf die Versorgung mit IL-2 etwa durch Effektorzellen wie aktivierte T-Zellen oder NK-Zellen angewiesen. Regulatorische T-Zellen exprimieren deshalb konstitutiv CD25, die α -Kette des hochaffinen IL-2-Rezeptors.

Ein (relativer) Mangel an IL-2 führt zu lymphoproliferativen Erkrankungen und intestinalen Entzündungen wie Gastritis und Kolitis^{27,127}. Aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit von IL-2 ist eine therapeutische Applikation schwierig. In verschiedenen Arbeiten^{56,59,62,63} konnte gezeigt werden, dass durch Gabe niedriger Dosen von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex regulatorische T-Zellen präferentiell expandiert werden. Der Antikörperkomplex wirkt agonistisch an CD25, verlängert die Halbwertszeit von IL-2 und steigert die Suppressionsfunktion regulatorischer T-Zellen⁶⁰. Der genaue Wirkmechanismus des IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplexes bleibt jedoch noch zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass im Tierversuch durch IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen sowohl in Milz und mesenterialen Lymphknoten als auch lokal in der Lamina propria mucosae des Kolons expandiert werden. Mittels IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex behandelte Tiere entwickeln Splenomegalie und Lymphadenomegalie. Nach Behandlung mit IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex ließ sich

durchflusszytometrisch eine signifikante Steigerung des Anteils regulatorischer T-Zellen an den CD4⁺ Zellen von Milz und mesenterialen Lymphknoten auf das 12- bzw. 7-fache nachweisen. Hingegen blieb der Anteil CD4⁺ T-Zellen im Lymphozytengate unbeeinflusst. Nicht-regulatorische T-Zellen werden somit durch IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex nicht wesentlich in ihrer Proliferation angeregt. Nach histologischer Bewertung von Kolongewebeproben konnte eine proinflammatorische Wirkung von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex ausgeschlossen werden. Immunfluoreszenzfärbungen auf Foxp3 und den T-Zell-Korezeptor CD4 zeigten eine signifikante Steigerung der Zahl regulatorischer T-Zellen in der Lamina propria mucosae des Kolons behandelter Tiere auf das 2- bis 4-fache der Kontrollen. Der Anteil der T-Zellen mit regulatorischem Phänotyp an den CD4⁺ T-Zellen der Lamina propria mucosae stieg dabei signifikant. Weiterhin wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung des Markers Ki67 das Proliferationsverhalten regulatorischer T-Zellen nach Gabe von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex untersucht. Sowohl in lymphoiden Follikeln als auch in der Lamina propria mucosae war die Zahl proliferierender regulatorischer T-Zellen signifikant gesteigert. Daraus wurde abgeleitet, dass nach Applikation von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex regulatorische T-Zellen nicht nur vermehrt in die Lamina propria mucosae des Kolons einwandern, sondern auch direkt am Wirkort expandieren.

Bei wildtyp Mäusen des Stammes C57Bl/6 war unter Anwendung eines statistischen Modells aufgefallen, dass in lymphoiden Follikeln des Darms regulatorische T-Zellen an proliferierenden Zellen akkumulieren¹¹⁷. Die Verteilung von regulatorischen T-Zellen und proliferierenden Zellen in lymphoiden Follikeln des Darms wurde in der vorliegenden Arbeit nach Applikation von IL-2/anti-IL-2-Antikörperkomplex untersucht. Auch hier wurde gezeigt, dass regulatorische T-Zellen überzufällig oft mit proliferierenden Zellen in Kontakt stehen. Es wird eine funktionelle Bedeutung der erhöhten Kontaktrate erwartet. Sie könnte histologisches Korrelat des „IL-2-Hungers“ regulatorischer T-Zellen sein, der durch von proliferierenden T-Zellen exprimiertes IL-2 gestillt wird. Weiterhin ist eine erhöhte Kontaktrate als Zeichen der Suppressionsaktivität regulatorischer T-Zellen durch andere Mechanismen möglich.

Mittels Matrix assisted laser desorption ionisation-Time of flight-Massenspektromie-Imaging (MALDI-Imaging) wurde die Proteinexpression in lymphoiden Geweben von Mäusen untersucht. Nachdem IL-2-mRNA in proliferierenden Zellen nachgewiesen worden war¹¹³, sollte die IL-2-Expression auch auf Proteinebene detektiert werden. Damit sollten proliferierende Zellen als Quelle von IL-2 *in situ* untersucht werden. Zunächst wurde die Methode an Gewebeproben von Ileum, Zäkum, Thymus und mesenterialem Lymphknoten

evaluiert. Dabei konnten Massen von Peptiden identifiziert werden, die spezifisch für lymphoide Gewebe bzw. Tunica mucosa oder Bindegewebe der Darmabschnitte sind. Nach immunhistochemischer Schnelfärbung von Ki67 mit DAB war eine Generierung von Massenspektren proliferierender Einzelzellen möglich. Die Zuordnung der detektierten Massen zu bestimmten Peptiden und Proteinen gelang jedoch nicht. Der Nachweis der Expression von IL-2 durch proliferierende T-Zellen auf Proteinebene *in situ* mittels MALDI-Imaging steht somit noch aus.

Literaturverzeichnis

1. Barnes, M.J. & Powrie, F. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity* 31, 401-411 (2009).
2. Frank, D.N., *et al.* Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13780-13785 (2007).
3. Artis, D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 8, 411-420 (2008).
4. Magalhaes, J.G., Sorbara, M.T., Girardin, S.E. & Philpott, D.J. What is new with Nods? *Curr Opin Immunol* 23, 29-34 (2011).
5. Coombes, J.L. & Powrie, F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* 8, 435-446 (2008).
6. Franke, A., *et al.* Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* 42, 1118-1125 (2010).
7. Anderson, C.A., *et al.* Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet* 43, 246-252 (2011).
8. Asquith, M. & Powrie, F. An innately dangerous balancing act: intestinal homeostasis, inflammation, and colitis-associated cancer. *J Exp Med* 207, 1573-1577 (2010).
9. Simms, L.A., *et al.* Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut* 57, 903-910 (2008).
10. Fritz, T., Niederreiter, L., Adolph, T., Blumberg, R.S. & Kaser, A. Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge. *Gut* (2011).
11. Rolhion, N., *et al.* Abnormally expressed ER stress response chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive Escherichia coli invasion. *Gut* 59, 1355-1362 (2010).
12. Abraham, C. & Cho, J.H. IL-23 and autoimmunity: new insights into the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* 60, 97-110 (2009).
13. Ahern, P.P., Izcue, A., Maloy, K.J. & Powrie, F. The interleukin-23 axis in intestinal inflammation. *Immunol Rev* 226, 147-159 (2008).
14. Maul, J., *et al.* Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 128, 1868-1878 (2005).
15. Izcue, A., Coombes, J.L. & Powrie, F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu Rev Immunol* 27, 313-338. (2009).
16. Tiittanen, M., Westerholm-Ormio, M., Verkasalo, M., Savilahti, E. & Vaarala, O. Infiltration of forkhead box P3-expressing cells in small intestinal mucosa in coeliac disease but not in type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 152, 498-507 (2008).
17. Waterfield, M. & Anderson, M.S. Clues to immune tolerance: the monogenic autoimmune syndromes. *Ann N Y Acad Sci* 1214, 138-155 (2010).
18. Glocker, E.O., *et al.* Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med* 361, 2033-2045 (2009).
19. Glocker, E.O., *et al.* Infant colitis--it's in the genes. *Lancet* 376, 1272 (2010).
20. Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M. & Hafler, D.A. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10, 490-500 (2010).
21. Gambineri, E., Torgerson, T.R. & Ochs, H.D. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 15, 430-435 (2003).
22. van der Vliet, H.J. & Nieuwenhuis, E.E. IPEX as a result of mutations in FOXP3. *Clin Dev Immunol* 2007, 89017 (2007).
23. Malek, T.R. & Castro, I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity* 33, 153-165 (2010).
24. Malek, T.R. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 26, 453-479 (2008).
25. Hoyer, K.K., Dooms, H., Barron, L. & Abbas, A.K. Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. *Immunol Rev* 226, 19-28 (2008).

26. Rochman, Y., Spolski, R. & Leonard, W.J. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol* 9, 480-490 (2009).
27. Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T. & Sakaguchi, S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* 201, 723-735 (2005).
28. Antony, P.A., *et al.* Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo. *J Immunol* 176, 5255-5266 (2006).
29. Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A. & Rudensky, A.Y. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6, 1142-1151 (2005).
30. Thomson, A.W., Turnquist, H.R. & Raimondi, G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol.* 9, 324-337. (2009).
31. Ouyang, W., *et al.* Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat Immunol* (2010).
32. Yao, Z., *et al.* Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood* 109, 4368-4375 (2007).
33. Battaglia, M., *et al.* Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol.* 177, 8338-8347. (2006).
34. Battaglia, M., Stabilini, A. & Roncarolo, M.G. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood.* 105, 4743-4748. Epub 2005 Mar 4743. (2005).
35. Hickman, S.P., Yang, J., Thomas, R.M., Wells, A.D. & Turka, L.A. Defective activation of protein kinase C and Ras-ERK pathways limits IL-2 production and proliferation by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 177, 2186-2194 (2006).
36. Chuck, M.I., Zhu, M., Shen, S. & Zhang, W. The role of the LAT-PLC-gamma1 interaction in T regulatory cell function. *J Immunol* 184, 2476-2486 (2010).
37. Tone, Y., *et al.* Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol.* 9, 194-202. Epub 2007 Dec 2023. (2008).
38. Long, M., Park, S.G., Strickland, I., Hayden, M.S. & Ghosh, S. Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor. *Immunity* 31, 921-931 (2009).
39. Mucida, D., *et al.* Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science.* 317, 256-260. Epub 2007 Jun 2014. (2007).
40. Ghoreishi, M., *et al.* Expansion of antigen-specific regulatory T cells with the topical vitamin d analog calcipotriol. *J Immunol.* 182, 6071-6078. (2009).
41. Verway, M., Behr, M.A. & White, J.H. Vitamin D, NOD2, autophagy and Crohn's disease. *Expert Rev Clin Immunol* 6, 505-508 (2010).
42. Wang, T.T., *et al.* Direct and indirect induction by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease. *J Biol Chem* 285, 2227-2231 (2010).
43. Harada, Y., *et al.* Transcription factors Foxo3a and Foxo1 couple the E3 ligase Cbl-b to the induction of Foxp3 expression in induced regulatory T cells. *J Exp Med* (2010).
44. Wei, L., Laurence, A. & O'Shea, J.J. New insights into the roles of Stat5a/b and Stat3 in T cell development and differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 19, 394-400 (2008).
45. Burchill, M.A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R. & Farrar, M.A. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 178, 280-290 (2007).
46. Tsuji-Takayama, K., *et al.* The production of IL-10 by human regulatory T cells is enhanced by IL-2 through a STAT5-responsive intronic enhancer in the IL-10 locus. *J Immunol* 181, 3897-3905 (2008).
47. Malek, T.R. & Bayer, A.L. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol* 4, 665-674 (2004).
48. Shen, Z., Chen, L., Hao, F. & Wu, J. Transcriptional regulation of Foxp3 gene: multiple signal pathways on the road. *Med Res Rev* 29, 742-766 (2009).

49. Cohen, A.C., *et al.* Cutting edge: Decreased accumulation and regulatory function of CD4⁺ CD25(high) T cells in human STAT5b deficiency. *J Immunol* 177, 2770-2774 (2006).
50. Tone, Y., *et al.* Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol* 9, 194-202 (2008).
51. Ruan, Q., *et al.* Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome. *Immunity* 31, 932-940 (2009).
52. Hermann-Kleiter, N. & Baier, G. NFAT pulls the strings during CD4⁺ T helper cell effector functions. *Blood* 115, 2989-2997 (2010).
53. Klunker, S., *et al.* Transcription factors RUNX1 and RUNX3 in the induction and suppressive function of Foxp3⁺ inducible regulatory T cells. *J Exp Med* 206, 2701-2715 (2009).
54. Hu, H., Djuretic, I., Sundrud, M.S. & Rao, A. Transcriptional partners in regulatory T cells: Foxp3, Runx and NFAT. *Trends Immunol* 28, 329-332 (2007).
55. Li, B., *et al.* FOXP3 ensembles in T-cell regulation. *Immunol Rev* 212, 99-113 (2006).
56. Wilson, M.S., *et al.* Suppression of murine allergic airway disease by IL-2:anti-IL-2 monoclonal antibody-induced regulatory T cells. *J Immunol* 181, 6942-6954 (2008).
57. Druey, K.M. & Greipp, P.R. Narrative review: the systemic capillary leak syndrome. *Ann Intern Med* 153, 90-98 (2010).
58. Krieg, C., Letourneau, S., Pantaleo, G. & Boyman, O. Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11906-11911 (2010).
59. Boyman, O., Kovar, M., Rubinstein, M.P., Surh, C.D. & Sprent, J. Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science*. 311, 1924-1927. Epub 2006 Feb 1916. (2006).
60. Tomala, J., Chmelova, H., Mrkvan, T., Rihova, B. & Kovar, M. In vivo expansion of activated naive CD8⁺ T cells and NK cells driven by complexes of IL-2 and anti-IL-2 monoclonal antibody as novel approach of cancer immunotherapy. *J Immunol*. 183, 4904-4912. (2009).
61. Letourneau, S., *et al.* IL-2/anti-IL-2 antibody complexes show strong biological activity by avoiding interaction with IL-2 receptor alpha subunit CD25. *Proc* 107, 2171-2176. Epub 2010 Jan 2119. (2010).
62. Webster, K.E., *et al.* In vivo expansion of T reg cells with IL-2-mAb complexes: induction of resistance to EAE and long-term acceptance of islet allografts without immunosuppression. *J Exp Med*. 206, 751-760. Epub 2009 Mar 2030. (2009).
63. Liu, R., *et al.* Expansion of regulatory T cells via IL-2/anti-IL-2 mAb complexes suppresses experimental myasthenia. *Eur J Immunol* 40, 1577-1589 (2010).
64. Chen, W. & Konkel, J.E. TGF-beta and 'adaptive' Foxp3(+) regulatory T cells. *J Mol Cell Biol* 2, 30-36 (2010).
65. Johansson-Lindbom, B., *et al.* Selective generation of gut tropic T cells in gut-associated lymphoid tissue (GALT): requirement for GALT dendritic cells and adjuvant. *J Exp Med*. 198, 963-969. Epub 2003 Sep 2008. (2003).
66. Iwata, M., *et al.* Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity*. 21, 527-538. (2004).
67. Iwata, M. Retinoic acid production by intestinal dendritic cells and its role in T-cell trafficking. *Semin Immunol*. 21, 8-13. Epub 2008 Oct 2011. (2009).
68. Powrie, F., Leach, M.W., Mauze, S., Caddle, L.B. & Coffman, R.L. Phenotypically distinct subsets of CD4⁺ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol* 5, 1461-1471 (1993).
69. Makita, S., *et al.* Intestinal lamina propria retaining CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is a suppressive site of intestinal inflammation. *J Immunol* 178, 4937-4946 (2007).
70. Mondino, A. & Mueller, D.L. mTOR at the crossroads of T cell proliferation and tolerance. *Semin Immunol*. 19, 162-172. Epub 2007 Mar 2023. (2007).
71. Turnquist, H.R., *et al.* Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4⁺ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3⁺ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. *J Immunol*. 178, 7018-7031. (2007).

72. Colombetti, S., Basso, V., Mueller, D.L. & Mondino, A. Prolonged TCR/CD28 engagement drives IL-2-independent T cell clonal expansion through signaling mediated by the mammalian target of rapamycin. *J Immunol.* 176, 2730-2738. (2006).
73. Monti, P., *et al.* Rapamycin monotherapy in patients with type 1 diabetes modifies CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T-cells. *Diabetes.* 57, 2341-2347. Epub 2008 Jun 2316. (2008).
74. Basu, S., Golovina, T., Mikheeva, T., June, C.H. & Riley, J.L. Cutting edge: Foxp3-mediated induction of pim 2 allows human T regulatory cells to preferentially expand in rapamycin. *J Immunol.* 180, 5794-5798. (2008).
75. Massey, D.C., Bredin, F. & Parkes, M. Use of sirolimus (rapamycin) to treat refractory Crohn's disease. *Gut.* 57, 1294-1296. (2008).
76. Penna, G. & Adorini, L. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol.* 164, 2405-2411. (2000).
77. Jeffery, L.E., *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol.* 183, 5458-5467. (2009).
78. de Zoeten, E.F., Wang, L., Sai, H., Dillmann, W.H. & Hancock, W.W. Inhibition of HDAC9 increases T regulatory cell function and prevents colitis in mice. *Gastroenterology* 138, 583-594 (2010).
79. Spange, S., Wagner, T., Heinzel, T. & Kramer, O.H. Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 185-198 (2009).
80. Li, B., *et al.* FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4571-4576 (2007).
81. Tao, R., *et al.* Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. *Nat Med.* 13, 1299-1307. Epub 2007 Oct 1297. (2007).
82. Moon, C., *et al.* Use of epigenetic modification to induce FOXP3 expression in naive T cells. *Transplant Proc* 41, 1848-1854 (2009).
83. Quintas-Cardama, A., Santos, F.P. & Garcia-Manero, G. Histone deacetylase inhibitors for the treatment of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 25, 226-235 (2011).
84. Vignali, D.A., Collison, L.W. & Workman, C.J. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8, 523-532 (2008).
85. Tang, Q. & Bluestone, J.A. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 9, 239-244 (2008).
86. Scalapino, K.J. & Daikh, D.I. CTLA-4: a key regulatory point in the control of autoimmune disease. *Immunol Rev* 223, 143-155 (2008).
87. Schmidt, E.M., *et al.* Ctla-4 controls regulatory T cell peripheral homeostasis and is required for suppression of pancreatic islet autoimmunity. *J Immunol* 182, 274-282 (2009).
88. Zelante, T., Fallarino, F., Bistoni, F., Puccetti, P. & Romani, L. Indoleamine 2,3-dioxygenase in infection: the paradox of an evasive strategy that benefits the host. *Microbes Infect* 11, 133-141 (2009).
89. Wing, K., *et al.* CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322, 271-275 (2008).
90. Gondek, D.C., Lu, L.F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S. & Noelle, R.J. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 174, 1783-1786 (2005).
91. Zhao, D.M., Thornton, A.M., DiPaolo, R.J. & Shevach, E.M. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 107, 3925-3932 (2006).
92. Nakamura, K., Kitani, A. & Strober, W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 194, 629-644 (2001).

93. Ghiringhelli, F., *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 202, 1075-1085 (2005).
94. Trotta, R., *et al.* TGF-beta utilizes SMAD3 to inhibit CD16-mediated IFN-gamma production and antibody-dependent cellular cytotoxicity in human NK cells. *J Immunol* 181, 3784-3792 (2008).
95. Andersson, J., *et al.* CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. *J Exp Med* 205, 1975-1981 (2008).
96. Fahlen, L., *et al.* T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 201, 737-746 (2005).
97. Han, Y., Guo, Q., Zhang, M., Chen, Z. & Cao, X. CD69+ CD4+ CD25- T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol* 182, 111-120 (2009).
98. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M.J. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 8, 1353-1362 (2007).
99. Kamanaka, M., *et al.* Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. *Immunity* 25, 941-952 (2006).
100. Uhlig, H.H., *et al.* Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol* 177, 5852-5860 (2006).
101. Rubtsov, Y.P., *et al.* Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 28, 546-558 (2008).
102. Kearley, J., Barker, J.E., Robinson, D.S. & Lloyd, C.M. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med* 202, 1539-1547 (2005).
103. Collison, L.W., *et al.* The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566-569 (2007).
104. Bardel, E., Larousserie, F., Charlot-Rabiega, P., Coulomb-L'Hermine, A. & Devergne, O. Human CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol* 181, 6898-6905 (2008).
105. Bopp, T., *et al.* Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 204, 1303-1310 (2007).
106. Deaglio, S., *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204, 1257-1265 (2007).
107. Xia, Z.W., *et al.* Heme oxygenase-1 attenuates ovalbumin-induced airway inflammation by up-regulation of foxp3 T-regulatory cells, interleukin-10, and membrane-bound transforming growth factor- 1. *Am J Pathol* 171, 1904-1914 (2007).
108. von Allmen, C.E., *et al.* Secretory phospholipase A2-IIID is an effector molecule of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 11673-11678 (2009).
109. McDonnell, L.A., *et al.* Peptide and protein imaging mass spectrometry in cancer research. *J Proteomics* (2010).
110. Nilsson, A., *et al.* Fine mapping the spatial distribution and concentration of unlabeled drugs within tissue micro-compartments using imaging mass spectrometry. *PLoS One* 5, e11411 (2010).
111. Cornett, D.S., Frappier, S.L. & Caprioli, R.M. MALDI-FTICR imaging mass spectrometry of drugs and metabolites in tissue. *Anal Chem* 80, 5648-5653 (2008).
112. Seeley, E.H. & Caprioli, R.M. Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18126-18131 (2008).
113. Händel, N. Die Rolle von Interleukin-2 für die Interaktion von Foxp3+ regulatorischen T-Zellen mit Effektorzellen im Darm. *Dissertation, Universität Leipzig* (2011).
114. Stallmach, A., *et al.* Protection of trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis by an interleukin 2-IgG2b fusion protein in mice. *Gastroenterology* 117, 866-876 (1999).
115. Read, S., Malmstrom, V. & Powrie, F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192, 295-302 (2000).

116. Carpenter, A.E., *et al.* CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* 7, R100 (2006).
117. Handel, N., Brockel, A., Heindl, M., Klein, E. & Uhlig, H.H. Cell-cell-neighborhood relations in tissue sections--a quantitative model for tissue cytometry. *Cytometry A* 75, 356-361 (2009).
118. Petkovic, M., *et al.* The signal-to-noise ratio as the measure for the quantification of lysophospholipids by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Analyst* 126, 1042-1050 (2001).
119. Gore, M.E., *et al.* Interferon alfa-2a versus combination therapy with interferon alfa-2a, interleukin-2, and fluorouracil in patients with untreated metastatic renal cell carcinoma (MRC RE04/EORTC GU 30012): an open-label randomised trial. *Lancet* 375, 641-648 (2010).
120. Atkins, M.B., *et al.* High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol* 17, 2105-2116 (1999).
121. Abrams, D., *et al.* Interleukin-2 therapy in patients with HIV infection. *N Engl J Med* 361, 1548-1559 (2009).
122. Lotze, M.T., *et al.* In vivo administration of purified human interleukin 2. II. Half life, immunologic effects, and expansion of peripheral lymphoid cells in vivo with recombinant IL 2. *J Immunol* 135, 2865-2875 (1985).
123. Ljungberg, B., *et al.* EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2010 Update. *Eur Urol* (2010).
124. Weiss, L., *et al.* In vivo expansion of naive and activated CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cell populations in interleukin-2-treated HIV patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10632-10637 (2010).
125. Miyara, M., Wing, K. & Sakaguchi, S. Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3+ regulatory T-cell activation and expansion. *J Allergy Clin Immunol* 123, 749-755; quiz 756-747 (2009).
126. Polansky, J.K., *et al.* DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol* 38, 1654-1663 (2008).
127. Tang, Q., *et al.* Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity* 28, 687-697 (2008).
128. Busse, D., *et al.* Competing feedback loops shape IL-2 signaling between helper and regulatory T lymphocytes in cellular microenvironments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3058-3063 (2010).
129. Sojka, D.K., Hughson, A., Sukiennicki, T.L. & Fowell, D.J. Early kinetic window of target T cell susceptibility to CD25+ regulatory T cell activity. *J Immunol* 175, 7274-7280 (2005).
130. Saruta, M., *et al.* Characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in Crohn's disease. *Clin Immunol* 125, 281-290 (2007).
131. Boden, E.K. & Snapper, S.B. Regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 24, 733-741 (2008).
132. Daniel, C., Wennhold, K., Kim, H.J. & von Boehmer, H. Enhancement of antigen-specific Treg vaccination in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010).
133. Travis, S.P., *et al.* European evidence-based Consensus on the management of ulcerative colitis: Current management. *J Crohns Colitis* 2, 24-62 (2008).
134. Van Assche, G., *et al.* The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Special situations. *J Crohns Colitis* 4, 63-101 (2010).
135. Matthews, L., *et al.* BAY 50-4798, a novel, high-affinity receptor-specific recombinant interleukin-2 analog, induces dose-dependent increases in CD25 expression and proliferation among unstimulated, human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Clin Immunol* 113, 248-255 (2004).
136. Davey, R.T., *et al.* Safety, tolerability, pharmacokinetics, and efficacy of an interleukin-2 agonist among HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *J Interferon Cytokine Res* 28, 89-100 (2008).

-
137. Margolin, K., *et al.* Phase I trial of BAY 50-4798, an interleukin-2-specific agonist in advanced melanoma and renal cancer. *Clin Cancer Res* 13, 3312-3319 (2007).
 138. D'Cruz, L.M. & Klein, L. Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol* 6, 1152-1159 (2005).
 139. Maloy, K.J. & Powrie, F. Fueling regulation: IL-2 keeps CD4+ Treg cells fit. *Nat Immunol* 6, 1071-1072 (2005).
 140. Koizumi, S., *et al.* Imaging mass spectrometry revealed the production of lyso-phosphatidylcholine in the injured ischemic rat brain. *Neuroscience* 168, 219-225 (2010).
 141. Franck, J., El Ayed, M., Wisztorski, M., Salzert, M. & Fournier, I. On-tissue N-terminal peptide derivatizations for enhancing protein identification in MALDI mass spectrometric imaging strategies. *Anal Chem* 81, 8305-8317 (2009).
 142. Zimmerman, T.A., Rubakhin, S.S., Romanova, E.V., Tucker, K.R. & Sweedler, J.V. MALDI mass spectrometric imaging using the stretched sample method to reveal neuropeptide distributions in aplysia nervous tissue. *Anal Chem* 81, 9402-9409 (2009).
 143. Amantonico, A., Urban, P.L. & Zenobi, R. Analytical techniques for single-cell metabolomics: state of the art and trends. *Anal Bioanal Chem* (2010).
 144. Holscher, D., *et al.* Matrix-free UV-laser desorption/ionization (LDI) mass spectrometric imaging at the single-cell level: distribution of secondary metabolites of *Arabidopsis thaliana* and *Hypericum* species. *Plant J* 60, 907-918 (2009).
 145. Rubakhin, S.S., Greenough, W.T. & Sweedler, J.V. Spatial profiling with MALDI MS: distribution of neuropeptides within single neurons. *Anal Chem* 75, 5374-5380 (2003).
 146. Kaletas, B.K., *et al.* Sample preparation issues for tissue imaging by imaging MS. *Proteomics* 9, 2622-2633 (2009).
 147. Chaurand, P., *et al.* Integrating histology and imaging mass spectrometry. *Anal Chem* 76, 1145-1155 (2004).
 148. Thiery, G., *et al.* Improvements of TArgeted multiplex mass spectrometry IMaging. *Proteomics* 8, 3725-3734 (2008).
 149. MacAleese, L., Stauber, J. & Heeren, R.M. Perspectives for imaging mass spectrometry in the proteomics landscape. *Proteomics* 9, 819-834 (2009).

Publikationen

Artikel:

Handel, N., Brockel, A., Heindl, M., **Klein, E.** & Uhlig, H.H. Cell-cell-neighborhood relations in tissue sections--a quantitative model for tissue cytometry. *Cytometry A* 75, 356-361 (2009).

Poster:

N. Händel, **E. Klein**, M. Heindl, J. Knauer, A. Brockel, J.-S. Frick, H.H. Uhlig (*Referent*). Local fuelling of IL-2 determines the tissue localisation of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells - proliferating cells signal inflammation and provide IL-2. ECCO 2009 Hamburg, Februar 2009.

E. Klein, N. Händel, J. Knauer, A. Brockel, J.-S. Frick, H.H. Uhlig Evidence that local fuelling of IL-2 determines the tissue localisation of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells 7th Leipzig Research Festival for Life Sciences 2008, Dezember 2008.

TECHNICAL NOTE

Cytometry

PART A
Journal of the
International Society for
Advancement of Cytometry

Cell-Cell-Neighborhood Relations in Tissue Sections—A Quantitative Model for Tissue Cytometry

N. Händel, A. Brockel, M. Heindl, E. Klein, H. H. Uhlig*

University Hospital for Children and Adolescents, Section of Pediatric Gastroenterology and Hepatology, University of Leipzig, Leipzig, Germany

Received 17 June 2008; Revision Received 1 December 2008; Accepted 20 December 2008

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

The first two authors contributed equally to this work.

Grant sponsor: Deutsche Morbus Crohn Colitis Ulcerosa Vereinigung (DCCV); Grant sponsor: Medical Faculty, University of Leipzig; Dissertation grant number: 943000-198, -157; Grant sponsor: European Crohn Colitis Organisation (ECCO).

*Correspondence to: Dr. H. H. Uhlig, Section of Paediatric Gastroenterology, University Hospital for Children and Adolescents, University of Leipzig, Liebigstrasse 20a, D-04103 Leipzig, Germany

Email: holm.uhlig@medizin.uni-leipzig.de

Published online 30 January 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com)

DOI: 10.1002/cyto.a.20705

© 2009 International Society for Advancement of Cytometry

• Abstract

Physical interactions between different cell types are a requirement for the initiation and maintenance of immune responses. The distribution pattern of cells within a tissue may result from specific cell-cell-interactions or random distribution. Tissue architecture, degree of inflammation, frequencies of cells, number of contact partners, cell type, and size as well as cell movement and contact time determine the distribution of cells within tissues. We developed a matrix model to determine the degree of expected random distribution of two cell types (A and B) and cell-cell-contacts within tissue sections. The model predictions were compared with experimental data derived from immunofluorescence microscopy. We implemented a computer algorithm for automatic image analysis to visualize and quantify cell-cell-neighborhood relations. Using the number of cells type A (a), the total cell number (t) and the mean number of cells that are in contact with cells type B (c_B), the ratio of cells type B in contact with cells type A can be described by $b_A/b = 1 - (1 - (a/t))^{c_B}$. We applied the model system to investigate the distribution of Foxp3⁺ regulatory T cells with Ki-67⁺ proliferating cells within mouse tissue sections. The matrix model provides a tool to describe the expected distribution of two different cell types and their cell-cell-contacts within tissues. Comparing the degree of expected random distribution with experimental data might help to propose functional cell-cell-interactions in tissue sections. © 2009 International Society for Advancement of Cytometry

• Key terms

tissue cytometry; cell-cell-interactions; quantitative histology; immunofluorescence; regulatory T cell; automatic image analysis

THE physical interaction of different cell types is a prerequisite for a variety of immune functions (1–3). Histological techniques such as laser scanning microscopy have been applied to investigate immune cells and immune cell interactions *in situ* (4). For application of high throughput tissue cytometry (also called tissomics), quantitative approaches are required to facilitate automatic or semiautomatic image analysis of tissue sections (5). Methods such as multi-color iterative immunostaining using slide-based cytometry will unquestionably produce large data sets improving individual cell phenotyping (6,7). Furthermore, modern immunostaining methods will also provide data about cell-cell-contacts *in situ* (tissue maps) (4). However, quantitative approaches to define the distribution of cell-cell-interactions are still limited. We developed a model to describe the distribution of cell-cell-contacts within tissues.

METHODS

Model

We used the following notation:
A, cell type A
B, cell type B



t, number of total cells in the tissue area
 a, number of cells type A
 b, number of cells type B
 a/t, ratio of cells type A among total number of cells
 b/t, ratio of cells type B among total number of cells
 c_B , (mean) number of cells that are in contact with cells type B
 b_A , (mean) number of cells type B that are in contact with cell(s) type A
 b_A/b , number of cells type B that are in contact with cells type A among all cells type B (contact ratio).

To determine the probability of cell-cell-interactions as a function of different cell frequencies and cell densities, we constructed defined matrices. A “cell” is defined as a nonblack space within the matrix. Each “cell” within the inner matrix (red rectangle) has a defined number of neighboring cells (1 to 6 neighbor cells; c_B) within the whole matrix (as presented in Fig. 1A). We choose the number from 1 to 6 possible contacts between cells because this range did match the range of contact partners we observed when investigating immune cells. Further numbers are possible. The matrices were filled with cells type A or B. In our model, a cell is either type A or B. The cells A and B were set within the matrix using a random generator. The number of cells type A, cells type B, and the number of cells type B that are in contact with cell type A were recorded (a, b, b_A).

A general equation for the contact ratio b_A/b applies for discrete and nondiscrete contact numbers (c_B from 0 to ∞): $b_A/b = 1 - (1 - (a/t))^{c_B}$

This equation can be developed and explained by sub-equations:

a/t, probability that chosen cell is of type A
 $(1 - (a/t))$, probability that chosen cell is not of type A
 $(1 - (a/t))^n$, probability that none of n cells surrounding cells type B is of type A
 $1 - (1 - (a/t))^n$, probability that at least one of n cells surrounding cells type B is of type A.

Immunofluorescence Staining

Tissue sections from C57Bl/6 wild type mice housed under SPF conditions have been used for immunofluorescence analysis. Tissue samples were snap-frozen and cryocut (6 μ m). Sections were fixed in paraformaldehyde. The endogenous peroxidase activity was inhibited using H_2O_2 and sodium azide. After blocking with normal mouse serum, sections were stained using FITC-conjugated mouse anti-human Ki-67 (clone B56, BD Biosciences, cross-reactivity with mouse Ki-67). After washing, sections were incubated with peroxidase-conjugated mouse anti-FITC IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) followed by washing steps and Fluorescein-tyramide amplification (PerkinElmer). After subsequent blocking of peroxidase activity and incubation with normal donkey serum (Sigma-Aldrich), Foxp3 was stained using a monoclonal rat anti-mouse Foxp3 (clone FJK-16s, eBioscience) followed by peroxidase-conjugated donkey anti-rat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) and Cyanine3-tyramide amplification. Dapi counterstaining was performed to

visualize cell nuclei. To ensure the nuclear localization of the Ki-67 and Foxp3 signals, we compared the staining with Dapi signals. Control staining was performed without primary antibody or irrelevant control antibodies to ensure specificity of the staining. Data of five to eight mice have been pooled. Fluorescence was detected using Keyence BZ-8000 fluorescence microscope. The following filter combinations have been used for Dapi (460/50), FITC (535/50) and Cyanine3 (630/60) (emission maximum/full width at half maximum in nm, respectively). Images were recorded without oil immersion using a Plan Apo objective (20 \times / 0.75) at 200 \times magnification. BZ viewer and Analyzer 2.5.1 software have been applied. The image resolution was 1,360 \times 1,024 pixel (24 bit depth). Before image analysis, a linear background reduction has been performed in the red and green channel (reduction in intensity 15 \pm 3% and 18 \pm 7%, respectively). Contrast has been increased in both channels by +10%.

Automatic Image Analysis

On the basis of the open source software CellProfiler (version 1.0.5122, www.cellprofiler.org), we developed a computer algorithm (pipeline) for the automatic image analysis. Both the pipelines and an example image are provided online as supporting information files (Haendel-pipeline-analysis.mat, Haendel-pipeline-images.mat and Haendel-example-image.tif). Haendel-pipeline-analysis.mat provides the complete quantitative analysis and export of numbers to Excel, whereas both pipelines combined generate and export a complete set of images as presented in Figure 1D.

CellProfiler software applies object identification using a three-step strategy (8,9): clumped objects are determined; the dividing lines between objects are drawn using parameters such as signal intensity, object size and shape. Some of the resulting objects are either deleted or merged depending on the algorithm used. Using this software, we identified Foxp3⁺ cells, Ki-67⁺ cells, and Dapi stained nuclei as well as cell contacts. After loading the three-channel color image into the CellProfiler software, the image was split into the red, green, and blue channel, respectively. The resulting single channel images were converted into gray scale. Foxp3⁺, Ki-67⁺, and Dapi stained cell nuclei were identified as objects using object diameter and signal intensity to distinguish clumped objects and draw dividing lines between objects. For Dapi positive nuclei, this procedure will be described in detail: Using our tissue fixation and staining method, the diameter of Dapi objects (cell nuclei) is 9.7 to 50 pixel units. We discard objects outside this diameter range. Too small objects are not merged with nearby larger objects. Objects touching the border of the image are not discarded. Otsu's global image threshold method was used to calculate a single threshold for the entire image group. To draw dividing lines between clumped objects, intensity has been used. Holes in identified objects are not filled.

The number of neighbor cells of each Foxp3⁺ cell has been determined by counting the Dapi positive cells that were in contact to Foxp3⁺ cells. The number of Foxp3⁺ cells in contact with Ki-67⁺ cells has been determined by counting the

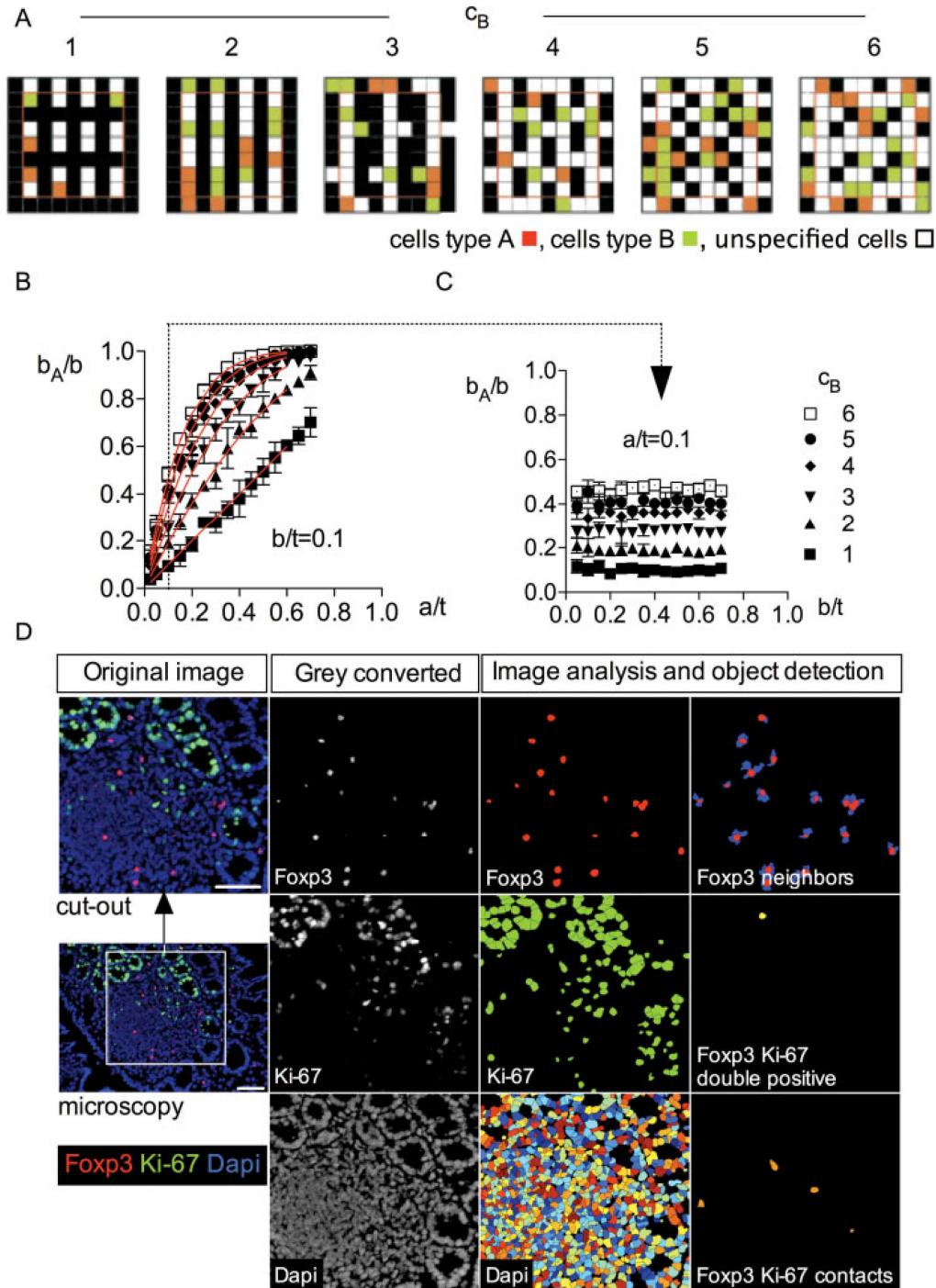


Figure 1. Matrix model and experimental data. (A) Matrix model and application. The “cells” have been filled with three types of cells (type A cells: red, type B cells: green, and unspecified cells: white). Each of the “cells” in the nonblack fields within the red margin of the six matrices has a defined number of contact partners within the matrix ($c_B = 1$ to 6). The cellular pattern and cell-neighborhood relations are determined by chance ($a/t = 0.15$ and $b/t = 0.15$ are constant, respectively). (B) and (C) Matrix simulation and model equation. The contact ratio b_A/b is shown in relation to the ratio of cell type A (a/t) and cell type B (b/t) among total cells, respectively. The graphs are shown for $c_B = 1$ to 6. To determine the contact ratio b_A/b , 59 matrices were calculated in parallel. In one calculation, this accounts for a total number of cells (t) between 1,180 ($c_B = 1$) and 2,419 ($c_B = 6$). Mean contact ratio $b_A/b \pm$ standard deviation are presented for five independent calculations (i.e. five times 1,180 to 2,419 cells were analyzed). The red lines show the respective graph according to the model equation $b_A/b = 1 - (1 - (a/t))^{c_B}$. (D) Automatic image analysis. Mouse colon sections were stained for Foxp3, Ki-67, and Dapi. A region of interest has been selected from the original microscopy image of $\times 200$ magnification. The upper part of the region of interest shows epithelial cells. In the lower part, a mucosa associated lymphoid follicle is shown. The image analysis and object identification were performed using CellProfiler software and the image analysis algorithm described in the Method section. For model calculations, only lymphoid areas were considered. Scale bar denotes 50 μm .

Ki-67 positive cells within a specified area around Foxp3⁺ cells. For this analysis, the object size of the Foxp3⁺ cells has been expanded by 5 pixels, and the Ki-67⁺ neighbor cells with cell-cell-overlap have been determined. Five pixels equals to 1.6 μm . T lymphocytes are characterized by a large nucleus and a small cytoplasm. We chose 5 pixels because this is the approximate distance we consider relevant while counting manually. Using this algorithm, CellProfiler software is not able to discriminate between true cell contacts and double positive cells because the algorithm is based on shared pixels. It is therefore of importance to subtract the number of Ki-67⁺ Foxp3⁺ double positive cells from the number of automatically determined cell contacts. To determine the number of Ki-67⁺ Foxp3⁺ double positive cells, the grey scale image of Ki-67⁺ cells was subtracted from the grey scale image of Foxp3⁺ cells resulting in an interim image. The interim image was again subtracted from the grey scale image of Foxp3⁺ cells. This sequence produces a grey scale image showing double positive cells. The Ki-67⁺ Foxp3⁺ double positive cells were identified and counted according to software algorithms described above. This procedure ensures that partially overlapping single positive cells are not identified and counted as double positive. To visualize all objects determined by the analysis software and to compare determined cells with the original image, all objects have been colored and presented within a separate image. Finally, the positions (x-y coordinates) of Foxp3⁺ cells, Ki-67⁺ cells, Dapi stained nuclei, Foxp3⁺ Ki-67⁺ double positive cells and Foxp3⁺ cells that are in contact with Ki-67⁺ cells are exported into an Excel spreadsheet (*.xls, Microsoft).

Comparison Between Manual Counting and Automatic Image Analysis

Correlation analysis between manual counting and automatic image analysis of Foxp3⁺ and Ki-67⁺ cells, Dapi stained nuclei, Foxp3⁺ Ki-67⁺ double positive cells as well as neighbor cells of Foxp3⁺ and Foxp3⁺ Ki-67⁺ cell contacts was carried out by two independent investigators. Manual counting was performed first. Cells that have been counted by observers decision were marked as objects in the image using SigmaScan Pro 5.0 software. After completion of the manual counting, automatic image analysis was performed. The settings of the automatic image analysis are described above and were determined by independent sample images of different mice. No iterative analysis was performed.

Statistics

All calculations were performed using Microsoft Excel and GraphPad Prism 4.00 or Prism 5 for MacOS X (GraphPad, San Diego, CA). Wald equation has been applied to calculate the 95% confidence interval of the contact ratio of Foxp3⁺ cells that are in contact with Ki-67⁺ cells. To compare manual counting with automatic image analysis we applied the Pearson correlation coefficient. Values of $P < 0.05$ were regarded as significant.

RESULTS

Matrix Model and Chance Equation

Using the matrix model, we determined the contact ratio b_A/b for defined ratios of cell type A and cell type B (Figs. 1A–1C). The contact ratio b_A/b depends on the ratio of cell type A among total cells (Fig. 1B). However, the contact ratio b_A/b is not dependent on the ratio of cell type B among total cells (Fig. 1C). The contact ratio b_A/b as determined by the matrix model can be described by the model equation $b_A/b = 1 - (1 - (a/t))^{c_B}$ (Fig. 1B).

Foxp3⁺ Cell and Ki-67⁺ Cell Neighborhood Relations in Mouse Colon Tissues

We observed that Foxp3⁺ cells are frequently associated with Ki-67⁺ proliferating cells. In accordance with the matrix model, the contact ratio of Foxp3⁺ cells in contact with Ki-67⁺ cells depends on the ratio of Ki-67⁺ cells but is not correlated with the Foxp3⁺ cell ratio (data not shown). We compared the experimentally determined contact ratio of Foxp3⁺ cells in Ki-67⁺ cell contact with the predictions of the matrix model. The predicted contact ratio of Foxp3⁺ cells that are in contact with Ki-67⁺ cells was calculated according to the following equation: $\text{Foxp3}^+_{\text{Ki-67}^+}/\text{number Foxp3}^+ = 1 - (1 - (\text{number Ki-67}^+/\text{total cells}))^{c_{\text{Foxp3}^+}}$.

In C57Bl/6 mouse colon sections the contact ratio of Foxp3⁺ cells in Ki-67⁺ cell contact significantly exceeded the theoretically predicted values (0.20 ± 0.03 vs. 0.13 , data of eight mice were pooled, for each mice between 55 and 174 Foxp3⁺ cells have been analyzed). In colon lymphoid tissue we analyzed a total of 40,932 cell nuclei (Dapi), 964 Foxp3⁺ and 1,866 Ki-67⁺ stained cells. The number of cell contacts (c_{Foxp3^+}) is 2.9 ± 0.3 . In other organs such as the mesenteric lymph node the contact ratio of Foxp3⁺ cells in Ki-67⁺ contact overlap with the predicted random distribution (0.11 ± 0.02 vs. 0.10 , data of five mice were pooled, for each mice between 144 and 297 Foxp3⁺ cells have been analyzed). In mesenteric lymph node, we analyzed a total of 27,858 Dapi stained nuclei, 1,218 Foxp3⁺, 903 Ki-67⁺ cells. The number of contact cells (c_{Foxp3^+}) is 3.1 ± 0.3 .

Our data suggest that Foxp3⁺ cells accumulate close to Ki-67⁺ cells within the mucosa associated lymphoid tissue of the colon. This accumulation cannot be explained by random distribution of the cells.

Automatic Image Analysis

An algorithm for automatic image analysis has been established to determine the relevant parameters for applying our model calculations (Fig. 1D). For correlation analysis between manual counting and automatic image analysis we investigated 17 independent images. The Ki-67 and Foxp3 stained colon sections of two C57Bl/6 mice were included into the analysis. 19,140 Dapi stained nuclei, 330 Foxp3⁺ cells, 995 Ki-67⁺ cells, 1,025 Foxp3 neighbor cells, 34 Foxp3⁺ Ki-67⁺ double positive cells and 86 Foxp3⁺ Ki-67⁺ cell-cell-contacts were analyzed. There is a strong correlation between automatic image analysis and manual counting (Dapi stained

TECHNICAL NOTE

nuclei $r = 0.99$, $P < 0.0001$; Foxp3⁺ $r = 0.98$, $P < 0.0001$; Ki-67⁺ $r = 0.99$, $P < 0.0001$; number of Dapi stained cells with contacts to Foxp3⁺ cells $r = 0.97$, $P < 0.0001$; Ki-67⁺ Foxp3⁺ double positive cells $r = 0.93$, $P < 0.0001$; number of Foxp3⁺ cells with contact to Ki-67⁺ cells $r = 0.85$, $P < 0.0001$). Manual counting as well as automatic image analysis detected a significant association of Foxp3⁺ cells with Ki67⁺ cells when compared with the theoretical prediction. This suggests that automatic image analysis is a useful tool for determining the parameters needed to investigate cell-cell-neighborhood relations according to our model.

DISCUSSION

The described matrix model and the model equation provide a tool for describing the neighborhood relations between two cell types within complex tissues. The estimated random distribution can be compared to the experimentally observed cell-cell-neighborhood distribution. We have shown that automatic image analysis of tissue sections may be used to identify relevant cell types and investigate cell-neighborhood relations. It is important to note that a cellular distribution pattern that is not attributable to random pattern according to our model is not per se of biological relevance. Our approach may help to propose candidate cell-cell-interactions and may therefore be applied in the screening phase. The direct cell-cell communication and involved molecules have to be shown by functional experiments.

We applied the open source CellProfiler software (8,9) that has several advantages: It is a freely available software tool. The modular composition allows flexible adjustment to perform user specific investigations. The software based on MATLAB modules allows applying complex algorithms for analysis of multiple images or image stacks, allows threshold application, pattern and object detection as well as automatic export into standard calculation or image processing software formats.

We used parameters such as frequencies of cell types and the number of contact partners per cell to model a complex system. Our two-dimensional model depends on several assumptions and simplifications: (1) The cellular distribution pattern within tissue sections is obviously a static picture. We assume that the distribution is representative for the dynamic interplay between cells at the time of tissue fixation. We assume that relevant interactions via cell-cell-contact are associated with increased contact time between two cells. We assume that relevant cell-cell-interactions lead to increased cell contact numbers compared to random distribution. However, there is a possible confounding factor: Two cell types may accumulate at a third cell type. Although both cell types would accumulate in close neighborhood, this would not be because of interaction between those two cell types. (2) Cells are distributed within a three-dimensional space. We assume that a two-dimensional (x - y axis) analysis may be sufficient to describe the distribution pattern between two cells. The number of cells analyzed within a specified area (x - y axis) depends on the thickness of the tissue section (z -axis). Using conven-

tional fluorescence microscopy, it is not useful to increase the thickness of investigated tissue sections beyond the diameter of the cells of interest. Confocal microscopy has the advantage of higher resolution and less Z -axis overlap due to high resolution optical sectioning. Confocal microscopy is generally therefore better suited to measure cell-neighborhood relations. If cell-cell-contacts can be determined in a three-dimensional space using 3D reconstruction of confocal microscopy derived images, it would be directly possible to apply our model equation as this would just increase the number of contact partner per cell. (3) We assume that cells in a tissue area are equally distributed. This is a simplification. Obviously, there is a degree of heterogeneity in the cellular microenvironment (presence of several cell types and structures such as lymphoid follicles, inflammatory infiltrate, parenchymal cells, blood and lymph capillaries, stroma cells, and epithelium). (4) We assume that cell types with similar size have a similar number of contact partners. This might not strictly be true because different cell types may interact with a different set and number of cells.

The transcription factor Foxp3 is functionally required for immunosuppressive activity of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in human and mice (10). Functional deficiency of Foxp3 causes IPEX syndrome in men or lethal lymphoproliferative disorder in mice (11,12). In the T cell transfer mouse model of colitis, regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells have therapeutic potential as these cells reverse established colitis (13,14). Several of the mechanisms associated with regulatory T cell activity *in vivo* suggest direct cell-cell-contacts between CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells and immune cells that are modulated by regulatory T cell activity (such as antigen presenting cells or pathogenic T cells). Regulatory T cells modulate the proliferation of effector T cells. The interaction of cells within tissues is a complex and dynamic process. Indeed, under inflammatory conditions, there is not only an increase in the frequency of regulatory T cells and Ki-67⁺ proliferating cells but also an increased density of cells in the intestinal mucosa (13,14). The activity of regulatory T cells leads to resolution of the dense inflammatory infiltrate and a decrease of proliferating Ki-67⁺ T cells. It is therefore not only important to normalize for cell frequencies but also for cell density. Our preliminary results suggest that the interactions of regulatory T cells with proliferating cells may play a role in the tissue localization or immunosuppressive activity of regulatory T cells. We speculate that the increased number of Foxp3⁺ T cells in contact with proliferating Ki-67⁺ cells represents a biological aspect of regulatory T cell activity *in situ*. However, the molecular mechanisms of this cell-cell-interaction have not been addressed and still have to be investigated.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Manja Kamprad, Jens Knauer, and Maïke Ziegler for help with mouse tissues and Hilmar Berger, and Matthias Brockel for helpful comments on the contact model.

LITERATURE CITED

1. Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN. Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* 2007;7:532–542.
2. Catron DM, Itano AA, Pape KA, Mueller DL, Jenkins MK. Visualizing the first 50 hr of the primary immune response to a soluble antigen. *Immunity* 2004;21:341–347.
3. Pape KA, Catron DM, Itano AA, Jenkins MK. The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. *Immunity* 2007;26:491–502.
4. Harnett MM. Laser scanning cytometry: Understanding the immune system in situ. *Nat Rev Immunol* 2007;7:897–904.
5. Tarnok A. Slide-based cytometry for cytomics—A minireview. *Cytometry Part A* 2006;69A:555–562.
6. Laffers W, Mittag A, Lenz D, Tarnok A, Gerstner AO. Iterative restaining as a pivotal tool for n-color immunophenotyping by slide-based cytometry. *Cytometry Part A* 2006;69A:127–130.
7. Mittag A, Lenz D, Gerstner AO, Tarnok A. Hyperchromatic cytometry principles for cytomics using slide based cytometry. *Cytometry Part A* 2006;69A:691–703.
8. Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR, Clarke C, Kang IH, Friman O, Guertin DA, Chang JH, Lindquist RA, Moffat J, Golland P, Sabatini DM. CellProfiler: Image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* 2006;7: R100.
9. Lamprecht MR, Sabatini DM, Carpenter AE. CellProfiler: Free, versatile software for automated biological image analysis. *Biotechniques* 2007;42:71–75.
10. Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science* 2007;317:627–629.
11. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27:20–21.
12. Bennett CL, Ochs HD. IPEX is a unique X-linked syndrome characterized by immune dysfunction, polyendocrinopathy, enteropathy, and a variety of autoimmune phenomena. *Curr Opin Pediatr* 2001;13:533–538.
13. Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting edge: Cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2003;170:3939–3943.
14. Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, Thompson C, Fanger A, Tannapfel A, Fontenot JD, Ramsdell F, Powrie F. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol* 2006;177:5852–5860.

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Emanuela Klein
Geburtsdatum: 25. 09. 1984
Geburtsort: Leipzig
Familienstand: ledig
Eltern: Holger Klein
Christiane Klein

Ausbildung:

Juni 2003 Abitur, Leibniz-Schule Gymnasium; Leipzig
Seit Oktober 2004 Studium der Humanmedizin; Universität Leipzig
Seit Oktober 2005 Stipendiatin des evangelischen Studienwerkes Villigst
August 2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „gut“ (2,5)
**August 2007-
März 2008** Studium der Humanmedizin; Staatliche Universität St. Petersburg/
Russland; Schwerpunkte: Ophthalmologie, medizinische Genetik
Wahlfach: Pädiatrische Gastroenterologie

Herbst 2011 geplant zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion:

seit März 2008 Promotion, Klinik und Poliklinik für Kinder und Jugendliche,
Universität Leipzig

Praxiserfahrung:

August 2003- Freiwilliger Friedensdienst
August 2004 Heilpädagogisches Zentrum Pskov/Russland
Seit August 2010 Praktisches Jahr am Städtischen Klinikum St. Georg,
Universitätsklinikum Leipzig, St. Elisabeth-Krankenhaus Leipzig

Fachbereiche Gastroenterologie und Infektiologie
Pädiatrie
Viszeralchirurgie

Emanuela Klein

Danksagungen

Besonders herzlich möchte ich mich bei meinem Betreuer und Doktorvater PD Dr. med. habil. Holm Uhlig bedanken. Ohne sein kontinuierliches Engagement, seine Ideen, kritischen Anmerkungen und Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn PD Dr. Roman Metzger, Herrn Prof. Wieland Kiess und Frau Prof. Antje Körner danke ich für die Möglichkeit, Laboratorien und Geräte für die Durchführung meiner Versuche zu nutzen. Frau Maike Ziegler danke ich für die hervorragende Hilfe bei der Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen. Frau Gabriele Scholz und Frau Nicole Peukert sowie allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder und Jugendliche Leipzig möchte ich für die herzliche Aufnahme und die Hilfe bei technischen Problemen danken.

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Dr. Jens Knauer für das Interesse an meiner Arbeit, die Zusammenarbeit bei der Durchführung der Mausexperimente, die Ermöglichung der Durchflusszytometrieexperimente und die Bereitstellung von Gewebeproben. Den Mitarbeitern des Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie Leipzig danke ich außerdem für die Möglichkeit der Nutzung des Versuchstierstalles.

Für die freundliche Bereitstellung des IL-2/IgG2b-Fusionsprotein danke ich Frau Prof. Dr. Silvia Bulfone-Paus, Abteilung Immunologie des Forschungszentrum Borstel, Deutschland.

Für die Bereitstellung von Gewebeproben möchte ich Frau Prof. Fiona Powrie sowie Frau Dr. Manja Kamprad danken.

Für die Zusammenarbeit bei der Durchführung von weiterführenden Experimenten und für die Bereitstellung von Gewebeproben sowie für hilfreiche Diskussionen möchte ich mich herzlich bei Dr. Mark Asquith, Sir William Dunn School of Pathology, Oxford, UK, bedanken.

Die Proteinexpressionsanalysen mittels MALDI-Imaging wären nicht möglich gewesen ohne die Zusammenarbeit mit der Bruker Daltonik GmbH Bremen und insbesondere Herrn Dr. Michael Becker. Für die Zusammenarbeit bei der Durchführung der MALDI-Experimente möchte ich mich bei Mario Heindl bedanken.

Für hilfreiche Kommentare zu MALDI-Imaging danke ich Herrn Dr. Matthias Müller und Herrn Dr. habil. Schiller. Bardo Wannenmacher, Sebastian Weise, Tassilo Kruis und Herrn Dr. Matthias Müller danke ich herzlich für hilfreiche Anmerkungen zu dieser Promotionsarbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Norman Händel, Mario Heindl, Michael Bauch, Dr. Nicole Pfeil und Dr. Andrea Brockel für die gute Zusammenarbeit in unserer Arbeitsgruppe, für die kritische Auseinandersetzung mit dieser Promotionsschrift, für Anregungen und interessierte Nachfragen.

Diese Promotionsarbeit wurde durch ein Forschungsstipendium der Europäischen Crohn und Colitis Organisation (ECCO) für PD Dr. med. habil. Holm H. Uhlig sowie den Ludwig-Demling-Forschungspreis der Deutschen Morbus Crohn/ Colitis ulcerosa Vereinigung e.V. (DCCV) unterstützt. Die Deutsche Zöliakie-Gesellschaft e.V (DZG) hat dankenswerter Weise die MALDI-Experimente durch den Zöliakie-Forscherpreis 2009 finanziell unterstützt.

Meiner Familie und Bardo Wannenmacher danke ich von Herzen für Unterstützung, Geduld und Motivation.